

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

YAŞA BAĞLI MAKÜLA DEJENERASYONU OLAN HASTALARDA
VİTREUS ÖRNEKLERİNDEKİ PROTEİN İÇERİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr.Hamza KÖSE

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

2018

**T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**YAŞA BAĞLI MAKÜLA DEJENERASYONU OLAN HASTALARDA
VİTREUS ÖRNEKLERİNDEKİ PROTEİN İÇERİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr.Hamza KÖSE

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

Prof.Dr. V.Levent KARABAŞ

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Nurşen YÜKSEL

Etik KurulOnayı: KOU-GOKAEK 2016/81

TEŞEKKÜR

Kliniğimiz ve üniversitemiz kurucularından, uzmanlık eğitimim sürecinde tanımaktan onur duyduğum değerli hocam Prof.Dr.Yusuf Çağlar'a,mesleki anlamda bizlerle tecrübelerini her zaman paylaşan ve biz asistanların herhangi bir sorunu olduğunda sabırla dinleyip yardımcı olan anabilimdalı başkanımız Prof. Dr. Nurşen Yüksel'e, cerrahi becerinin sabır, disiplin ve çok çalışmakla oluşabileceğini kendi meslek hayatıyla bize gösteren ve cerrahi eğitimimde büyük yeri olan aynı zamanda tez sürecinde desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Levent Karabaş'a, asistanlığımızda bizlere çok zor gelen pediatrik oftalmolojiyi anlamamızı sağlayıp, sevdiren ve mesleğinde titizliği hiç elden bırakmayan değerli hocam Prof. Dr. Özgül Altıntaş'a, cerrahi eğitim ve meslek hayatıyla örnek olan ayrıca tez yapım sürecinde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili hocam Doç. Dr. Berna Özkan'a, asistanlığım süresince mesleki anlamda desteğini esirgemeyen ve cerrahiye başlarken emekleme dönemlerimde sabırla yanımda olan değerli hocam Yard. Doç. Dr. Dilara Pirhan'a, asistanlık sürecimde önce kıdemlim olarak sonra da hocam olarak mesleki anlamda desteğini esirgemeyen Doktor Öğretim Görevlisi Dr.Sevgi Özel Subaşı'na

Tez sürecinde benden yardım ve desteklerini esirgemeyen sevgili hocalarım, Prof.Dr. Murat Kasap, Doç.Dr. Gürler Akpınar ve Yrd.Doç.Dr Aylin Kanlı'ya , ayrıca tez sürecindeki desteklerinden dolayı Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine

Bu günlere gelmemi sağlayan, ömrüm boyunca layık olmaya çalışacağım babama, anneme, kardeşlerime

Asistanlık süresince ailelerimizden çok birlikte zaman geçirdiğimiz, acı-tatlı birçok anılarımız olan ve çalışmaktan her zaman keyif aldığım değerli asistan hekim arkadaşlarıma,

Asistanlığım süresince destek olan hemşire, sekreter ve personel arkadaşlarıma

Bu süreçte desteğini esirgemeyen, yanımda olmasından büyük mutluluk duyduğum yol arkadaşım Özge'ye

Şükranlarımı sunarım...

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	2
TEŞEKKÜR	3
İÇİNDEKİLER	4
SİMGE VE KISALTMALAR	5
TABLOLAR VE ŞEKİLLER DİZİNİ	6
1. GİRİŞ VE AMAÇ	8
2 GENEL BİLGİLER	9
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
4. BULGULAR.....	38
5. TARTIŞMA.....	62
6.SONUÇLAR.....	74
7.ÖZET-	75
8. ABSTRACT.....	76
9.KAYNAKLAR.....	77

SİMGE-KISALTMALAR

YBMD: Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu

RPE: Retinal Pigment Epiteli

KNVM: Koroid Neovasküler Membran

VEGF: Vasküler Endotelyal Growth Faktör

PED: Pigment Epitel Dekolmanı

FFA: Fundus Floresein Anjiografi

ICGA: İndosiyenin yeşili Anjiografi

SDS-PAGE: Denatüre edici PAGE

ND-PAGE: Non Denatüre edici PAGE

HPLC: Yüksek Performans Likit Kromatografi

MALDI-ToF: Matrix Assisted Laser Desorption İonization Time of Flight

ESI-MS: Electrospray İonization Mass Spectrometry

SELDI-ToF: Surace Enhanced Laser Desorption İonization

AAG: Alfa 1 Asit Glikoprotein

LRG-1: Leucine Rich Alpha 2 Glikoprotein

HP : Haptoglobin

APO-E: Apolipoprotein E

TABLolar-ŞEKİLLER

Şekil 1. Retinanın histolojik kesiti

Şekil 2. Vitreus örneği alınması ve intravitreal enjeksiyon tekniği

Şekil 3. Kontrol grubuna ait K2 vitreus örneğinin çöktürme sonrası ve öncesi bir boyutlu jel elektroforezi görüntüsü

Şekil 4. Kontrol ve hasta grubuna ait vitreus örneklerinden çöktürme sonrası bir boyutlu jel elektroforezi görüntüsü

Şekil 5. Kontrol ve hasta havuzu örneklerinin bir boyutlu jel elektroforezi görüntüsü.

Şekil 6. 2D jel görüntüsü: pH3-10 aralığında protein dağılımını ve sayısını belirlemek amacıyla yapılmış 7cm'lik 2D jel görüntüsü

Şekil 7. 11 cm'lik geniş jellerde ve pH 3-10 aralığında çalışılmış jellerin PDQuest Advance yazılımı ile analizi

Şekil 8. Her bir grup için elde edilen 2D jel görüntüleri ve regülasyon görülen ve kesilip tanımlanan proteinlerin jel üzerindeki pozisyonları

Şekil 9. MALDI-TOF/TOF spektrum görüntüsü

Şekil 10. SSP 0202, SSP 1103, SSP 1104, SSP 1203, SSP 1511, SSP 2104, SSP 3006, SSP 3007 ve SSP 3008 numaralı protein spotlarının yakın-çekim resimleri

Şekil 11. SSP 3020, SSP 4011, SSP 5005, SSP 5006, SSP 6003, SSP 7003, SSP 7004 ve SSP 8003 numaralı protein spotlarının yakın-çekim resimleri

Şekil 12. Proteinlerin moleküler fonksiyon özellikleri baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

Şekil 13. Proteinlerin katıldığı biyolojik prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

Şekil 14. Biyolojik prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

Şekil 15. BioGrid analizi sonucu Alpha-crystallin A chain protein için oluşturulan interaktom verisi (Minimum delil seviyesi 3 olarak alınmıştır).

Şekil 16. BioGrid analizi sonucu Alpha-crystallin B chain protein için oluşturulan interaktom verisi (Minimum delil seviyesi 3 olarak alınmıştır)

Şekil 17. STRING Analiz sonucu.

Şekil 18. STRING analizi sonucunda elde edilen verilerin biyolojik prosesler ile ilişkisi

Şekil 19. STRING analizi sonucunda elde edilen verilerin moleküler fonksiyon ile ilişkisi

Şekil 20. STRING analizi sonucunda elde edilen verilerin hücresel komponentler ile ilişkisi

Tablo 1. MADLDI-TOF/TOF analizi sonrasında tanımlanan protein spotlarına ait veriler

Tablo 2. Miktarlarında regülasyon görülen ve MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinlerin gruplara göre hesaplanmış regülasyon oranları.

Tablo 3. Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu moleküler fonksiyonlarına göre dağılım tablosu

Tablo 4. Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu biyolojik proseslerine göre dağılım tablosu.

Tablo 5. Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu pathway'e göre dağılım tablosu



1.GİRİŞ

1.1 Giriş ve Amaç

Yaşa Bağlı Maküla Dejeneresansı (YBMD), makülayı tutan, genetik eğilim ve çevresel faktörlerle ortaya çıkan, prevalansı yaşla artan, henüz etkin tedavisi olmayan, ilerleyici, kalıcı santral görme kaybına neden olan hastalıktır. Hastalığın etyopatogenezi ve risk faktörleri tam olarak bilinmemektedir. Kısıtlı tedavi seçenekleri, hastalıktan korunmanın önemini arttırmış ve ciddi halk sağlığı sorunu yapmıştır(1).

Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu (YBMD) gelişmiş ülkelerde 65 yaş ve üzeri santral görme kaybının en önemli nedenidir (2). YBMD'nin neovasküler (yaş) ve non-neovasküler (kuru) olmak üzere iki ana tipi vardır. Hastaların % 10'unu neovasküler tip oluşturmaktadır. Kuru tip YBMD retina pigment epitelinde (RPE) değişiklikler, atrofi, drusen ile karakterizedir. Yaş tip YBMD ise koroidal neovaskülarizasyon ile karakterizedir (2).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 40 yaşından büyük kişilerde en az bir gözde ileri YBMD 1.75 milyon bireyi etkilerken 2020 yılında bu sayının % 50 oranında artması beklenmektedir ve 7 milyon kişinin de YBMD için risk altında olduğu belirtilmektedir (3,4). Ülkemizde YBMD prevalansı hakkında detaylı bilgi mevcut değildir.

Dünyada her yıl 500.000 yeni neovasküler YBMD olgusu ortaya çıkmaktadır. YBMD'ye bağlı körlüklerin % 90'ından sorumlu olan yaş tipte patogenezi bilinmeyen bir sebeple tetiklenen anjiyogenez, koroid neovasküler membran (KNVM) oluşumu ile sonuçlanmaktadır. İleri yaş ve sigara kanıtlanmış en önemli iki risk faktörüdür. Ancak bunların dışında genetik, ırk, cinsiyet, sosyoekonomik özellikler, kırma kusuru, obezite, vitaminler, sistemik hastalıklar, hormonal faktörlerin de etkili olabileceği düşünülmektedir (5).

Koroidal neovasküler membranın (KNV) yerleşimi, büyüklüğü ve fundus floressein anjiyografideki (FFA) karakteristikleri prognoz ve tedavi alternatifleri açısından son derece önemlidir. FFA bulguları açısından lezyonlar klasik, baskın klasik, minimal klasik veya gizli

olarak sınıflandırılırken, yerleşim açısından ise ekstrafoveal, jukstafoveal ve subfoveal olarak ayrılmaktadır (6,7).

YBMD ile ilgili yapılan çalışma modellerinde, retina pigment epitelyal (RPE) hücrelerinde artmış VEGF-A mRNA ve proteinin koroid neovasküler membran (KNVM) gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir(8). Önemli olarak, RPE hücrelerinde VEGF-A salgılanması, KNV lezyon büyüklüğünde bir artışa yol açar(9). Son yıllarda, anti-VEGF ilaçların geliştirilmesi ve ticarileşmesi intraoküler neovaskülarizasyonlu hastaların tedavisini değiştirmiştir(10). Neovasküler YBMD'yi hedef alan yeni tedaviler, klinik çalışmalarda aktif olarak test edilmektedir. Etki mekanizması olarak anti-VEGF dışında PDGF(Trombosit kaynaklı büyüme faktör), Angiopoietin 2, siRNA, intravitreal implant olarak üzerinde çalışılan Alpha-2-antagonist üzerinden aktif çalışmalar bulunmaktadır (11).

Proteomiks, çok genel anlamı ile RNA-protein ilişkisini açıklamaya çalışan, hücre ve dokuları oluşturan proteinlerin ifade bulmaları sırasındaki post-transkripsiyonal modifikasyon ve translasyon sırasında oluşan değişiklikler ile ilgilenen bir bilim dalıdır. (12).Çalışmamızda, Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu olan hastalardan ve sağlıklı kontrol gruplarının vitreus örneklerinde protein analizi yardımıyla YBMD patofizyolojisini aydınlatmayı ve bulduğumuz bulgularla yeni tedavilere ışık tutabilmeyi amaçlıyoruz.

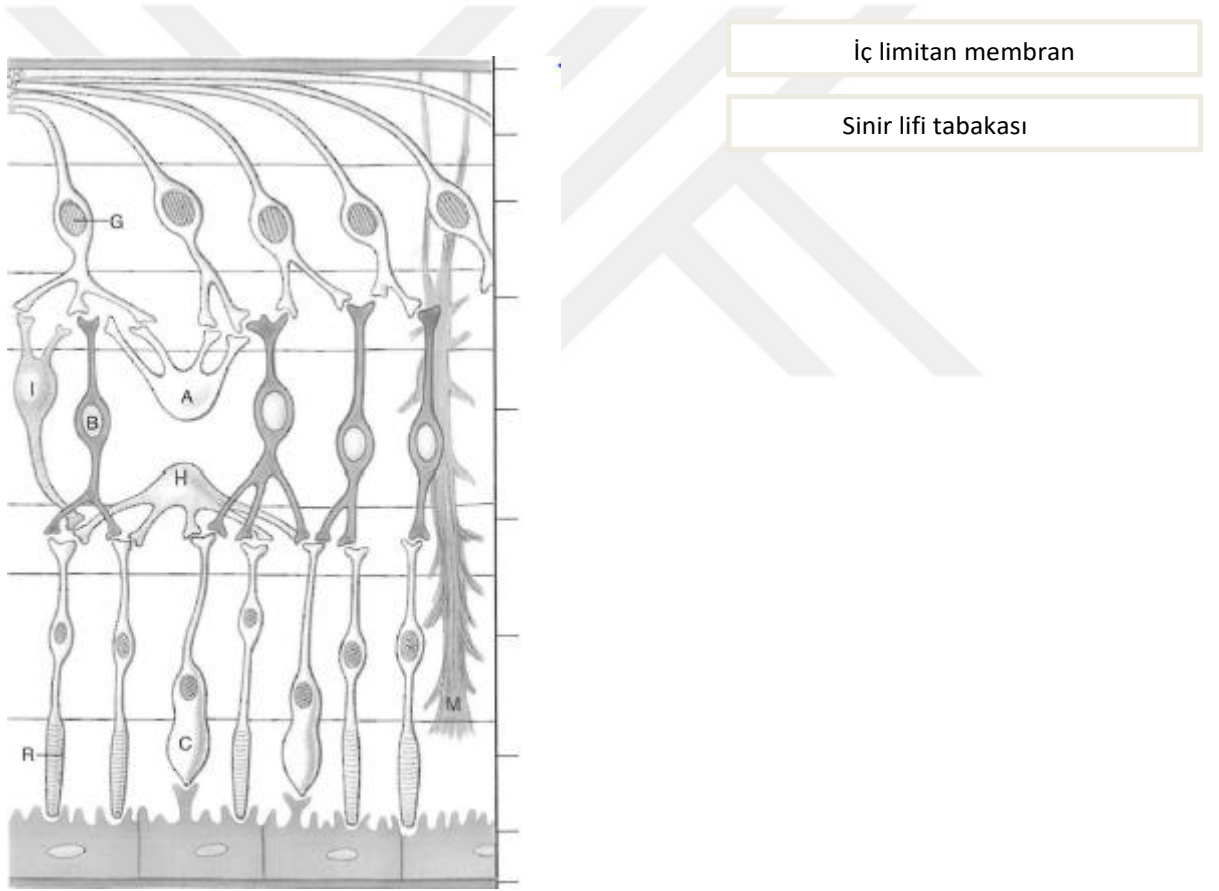
2.GENEL BİLGİLER

2.1 Retina Anatomisi ve Histolojisi

Retina nöroektoderm kökenli, ışık sinyallerinin sinirsel iletiye dönüştürüldüğü, ince, şeffaf yapıda bir dokudur. Kalınlığı 100 ile 300 mikron arasında değişen retina içten (vitreus tarafından), dışa doğru (koroid tarafına) şu tabakalardan oluşur (Şekil 1):

- 1) İç limitan membran (Müller Hücreleri terminal uzantıları ve bazal membran)
- 2) Sinir lifi tabakası (ganglion hücre aksonları)
- 3) Ganglion hücre tabakası (ganglion hücre çekirdekleri)

- 4) İç pleksiform tabaka (bipolar, amakrin, ganglion hücreleri sinaptik bağlantıları)
- 5) İç nükleer tabaka (bipolar, horizontal, amakrin ve Müller hücre çekirdekleri)
- 6) Dış pleksiform tabaka (Fotoreseptör, bipolar, horizontal hücrelerin sinaptik bağlantıları, Henle lif tabakası)
- 7) Dış nükleer tabaka (fotoreseptör çekirdekleri, kon nükleusları dış grupta, rod nükleusları daha çok iç grupta)
- 8) Dış limitan membran
- 9) Fotoreseptör tabakası



Şekil 1. Retinanın histolojik kesiti: R: Rod fotoreseptör, C: Kon fotoreseptör, B: Bipolar hücresi, H: Horizontal hücresi, A: Amakrin hücresi, G: Ganglion hücresi, M: Müller hücresi

Duyusal retina;

Fotoreseptörler: Koni ve basil (rod) olarak adlandırılan, retina pigment epiteli (RPE) ile dış limitan membran arasında yer alan iki tip fotoreseptör bulunmaktadır. Her bir fotoreseptörün iç ve dış olmak üzere iki segmenti vardır(13). Basiller alaca karanlıkta ve gece görmeden (skotopik görme) sorumlu olup, foveada hiç bulunmaz ve periferde doğru sayıları hızla artar, uç periferde hafifçe azalır(14). Koniler ise parlak ışııkta görme (fotopik görme), renkli görme ve keskin görmeden sorumludurlar. En çok foveada bulunurlar

Bipolar Hücreler: Radyal yerleşimli olan bu hücrelerin, dendritleri dış pleksiform tabakada koni ve basiller ile sinaps yapar, aksonları ise iç pleksiform tabakada gangliyon ve amakrin hücrelerle sinaps yapar(14). Görevleri fotoreseptörlerden gelen sinyali gangliyon hücrelere aktarmaktır.

Gangliyon hücreler: Retinanın iç kısmında bulunurlar. Gangliyon hücreleri multipolar hücrelerdir, dendritleri bipolar hücreler aksonları ve amakrin hücreler ile sinaps yapar.(14) Optik sinir gangliyon hücre aksonlarının birleşmesiyle oluşur(15).

Horizontal hücreler: Horizontal hücreler basil ve konilerin terminal genişlemelerinin yakınlarında yer alan multipolar hücrelerdir. Fotoreseptörleri inhibe eden antagonistik internöronlardır(15).

Amakrin Hücreler: : Çoğunlukla inhibitör internöronlardır. Bol sitoplazmalı, parçalı nükleuslu ve çok sayıda dendritleri olan aksonsuz hücrelerdir.

Müller Hücreleri: Retinanın glial hücre yapısını oluşturan en önemli hücrelerdir. Retinada mikroglia ve makroglia (Müller hücreleri, astrosit, oligodendrosit ve Schwann hücreleri) olmak üzere iki tip nöronal olmayan hücre grubu bulunur. Mikroglial hücreler yardımcı immün hücreler, makroglialar ise retinal nöronların fonksiyonlarını düzenleyen hücrelerdir(15). Retinanın destek yapısını oluşturan Müller hücreleri, dış limitan membrandan iç limitan membrana kadar uzanmaktadır.

Retina Pigment Epiteli

Retina pigment epiteli (RPE), Bruch membranı ve retina arasında bulunan nöroektodermal kökenli, tek katlı, altıgen şekilli küboidal hücre tabakasıdır. Optik disk kenarından ora serrataya kadar uzanır. Rod ve kon hücrelerinin dış kısmının fagositozu ve ışık absorpsiyonunda rol oynarken aynı zamanda dış kan-retina bariyerini de oluşturur(16).RPE'nin görevleri; fotoreseptör dış segment fagositozu, A vitamini metabolizmasını düzenlemek, rodopsin sentezini düzenlemek, vizuel pigment yenilenmesi, sitokin ve büyüme faktörlerinin salgılanması, oksidatif stresten korunma, avasküler dış retinanın sağlanması, immünitinin sağlanması, dış kan retina bariyerinin (KRB) oluşturulması ve devamlılığının sağlanması, subretinal alandaki sıvı ve besin kontrolünü ve retinal yapışıklığın sağlanmasıdır(14).

Bruch Membranı

RPE'nin taban kısmıdır ve RPE bazal membranı, iç kollajen alan, esnek lifler, dış kollajen alan, koryokapillaris endoteli olmak üzere beş tabakadan oluşur. Yaşam boyunca, yağlar ve oksidatif olarak harap edilen maddeler bruch membranı içinde birikirler(16).

Koroid

Kan arka silyer arterler ile koroide girer. Koroidal damarların dış tabakası, Haller tabakası olarak bilinir ve göreceli olarak büyüktür. Bu damarlar Sattler tabakası olarak bilinen tabakadaki küçük çaplı damarlarla birleşir. Böylelikle arteryel basıncın koroid seviyesine gelmesi düzenlenmiş olur. Arka kutupta, koryokapilaristeki kapillerler lobüler yapıda olmasada, işlevsel olarak lobül oluşturan bir ağısı yapıdadır. Bu ağısı yapı fovea altında 4-5 kat iken ora serrataya doğru gidildikçe 1-2 kata kadar düşer. Kan koryokapillaris varınca, ampullalara dönüşen venüller içerisinde toplanır ve vorteks venler yardımı ile üst oftalmik vene ulaşır. Retina, ağırlığına göre metabolizma oranı en yüksek dokulardandır ve yoğun kan akımına sahip koroid tarafından beslenir. Koroidi terk eden venöz kanda dahi çok yüksek oranda oksijen mevcuttur. Böylece

koryokapillaris üzerinde yer alan RPE hücreleri herhangi bir hücreden daha çok oksijene maruz kalırlar ve oksidatif hasar olasılığı da artar(17).

2.2 Vitreus Anatomisi

Vitreus; lens, arka kamara, silier cisim ve retina arasında yerleşen, göz küresi hacminin yaklaşık %80'ini oluşturan, gözün en büyük içyapısal elemanıdır. Vitreus, vitreus tabanı, kortikal vitreus ve kor vitreus gibi farklı bölümlerden meydana gelir. Erişkinde ortalama 4 mm³ olup, ağırlığı ise yaklaşık 4 gr'dır(14). Vitreus yapısal olarak sıvı içeriği fazla hyaluronik asit matrikste asılı kollejen fibril ağından ibarettir ve %99'u su olmasına rağmen viskozitesi suyunkinin yaklaşık iki katı kadardır. Geriye kalan %1 'lik kısım ise düşük molekül ağırlıklı yağlar ve inorganik tuzlardan, çözülebilen ve çözilemeyen proteinlerden ve hyaluronik asitten oluşur(15). Vitreusta bulunan serbest amino asitler serumdaki miktarının beşte biri kadardır. Vitreusta hücrenel eleman olarak en sık hyalosit olarak bilinen mononükleer fagositler olmakla beraber daha az sayıda fibroblast ve glial hücreler sayılabilir. Vitreusun en önemli protein içeriğini kollajen oluşturur. (Şekil 3).

2.3 YBMD Epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 60 yaş üstü nüfus 2020'de 1 milyar, 2050'de 2 milyar kişi olarak tahmin edilmektedir(2). Halen tüm dünyada 30-50 milyon kişide var olduğu bildirilen YBMD'li hasta sayısının, yaşam süresinin giderek artması göz önünde bulundurularak, gelecek on yılda iki katına çıkması beklenmektedir(2). Framingham göz çalışmasında 2631 görme kaybı olan kişide etyolojide % 15.5 senil katarakt, % 3.1 diyabetik retinopati, % 8.8 YBMD saptanmıştır ve YBMD'nin 5 yıllık insidansı 65 yaş için % 2.5, 70 yaş için % 6.7, 75 yaş üstü için % 10.8 olarak bildirilmiştir(18). Tüm çalışmalarda YBMD prevalansı yaşla birlikte artış göstermektedir. Beyaz ırkın çoğunlukta olduğu geniş toplum

tabanlı 'Beaver Dam Göz Çalışması' (BDES)'te 75 yaş üstü 15 yıllık insidansı erken YBMD'de % 24, geç YBMD'de % 8'dir(19).Coğrafik atrofinin veya neovasküler YBMD'nin 55 yaş öncesinde nadir olduğu, 75 yaş ve üzeri hastalarda daha sık olduğu görülmektedir. Latin ve Latin kökenli bireylerden oluşan 'Los Angeles Latino Göz Çalışması' (LALES) 70-79 yaş arası YBMD prevalansı % 1.5 iken, 80 yaş üstü % 8.5 olarak saptanmıştır. BDES'te 70-79 yaş arası prevelansı % 3.7, 80 yaş üstü ise % 9.5 olarak saptanmıştır (19, 20). Baltimore göz çalışmasında görme kaybı beyazlarda % 2.7, siyahlarda % 3.3 olarak saptanmış ve bunların % 14.4'ü YBMD'e, % 7.3'ü retinal hastalıklara bağlanmış ve bu çalışmada retinal hastalıkların görme kaybındaki sıklığı vurgulanmıştır(21).

2.4 YBMD Etyopatolojisi

YBMD'nin kesin patofizyolojisi halen anlaşılamamış olmasına rağmen yapılan çalışmalarda çok sayıda biyolojik yol tanımlanmıştır. Bunlar yaşlanma, RPE hücrelerinde lipofuksin birikimi, koroidal iskemi ve oksidatif stres gibi çeşitli patolojik süreçleri içermektedir.

Yaşlanma: RPE fotoreseptörler için çok önemli olan metabolik ve destekleyici fonksiyonlara sahiptir. Fotoreseptör hücrelerin dış kısımlarında disk şeklindeki membran yapıları bulunmaktadır. Bu diskler düzenli olarak yenilenmekte ve eski diskler hücrelerin dış kısmına itilmektedir. İşte RPE bu dökülen fotoreseptör dış segmentlerini fagosite eder. Metabolik artıklar ise daha sonra koryokapillaris yolu ile gözden uzaklaştırılmaktadır(22).

Yaşlanma ile birlikte RPE hücrelerinin sayısında zamanla azalma olmaktadır. Hücre sayısında azalma kalan hücrelerin metabolik yükünün artmasına ve metabolik artıkların tam olarak uzaklaştırılamamasına sebep olur. Bu durumda artık materyaller hücre sitoplazmasında birikmeye başlar. Bu birikim kalan RPE hücrelerinin de ölümüne yol açabilir(23).

RPE sitoplazmasında biriken fagozomal birikimler lipofuksin olarak adlandırılır. Yaşla birlikte lipofuksin birikimi giderek artmaktadır(24).

RPE sitoplazmasında lipofuksin biriktikçe fonksiyonel sitoplazma gittikçe azalır ve RPE fonksiyonunda bozukluklar ortaya çıkmaya başlar. Lipofuksin, RPE hücrelerinde oksidatif hasara ve lizozomal enzimatik faaliyetin azalmasına neden olabilir(25,26).RPE hücrelerinin ölümü ile fotoreseptör kaybı ve koryokapillarisde atrofiye neden olabilir(27).

Bruch membranı YBMD patogenezinde kritik bir rol oynamaktadır. Gençlerde ve sağlıklı gözlerde Bruch membranı oksijen ve glukoz gibi sıvı ve küçük molekülleri geçiren, yapısal bir destek olarak fonksiyon gösterir. Ayrıca antianjiojenik moleküller içererek elastin tabaka da neovaskularizasyona karşı bir bariyer olarak işlev görür.

RPE, VEGF üretir. VEGF Bruch membranından koryokapillarisde geçebilir. Buna rağmen Bruch membranındaki antianjiojenik moleküller koroidden gelen neovasküler kılcal damarların büyümesini engelleyerek yaş tip YBMD'nin gelişmesine engel olur.

Bruch membranı 5 tabakadan oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla; RPE bazal membranı, iç kollajen tabaka, elastik tabaka, dış kollajen tabaka ve koriokapillarisin bazal membranıdır. Yaşlanmayla birlikte Bruch membranında da bazı değişiklikler görülmeye başlar. Bruch membranında görülen ilk dejenerasyon belirtileri bazal laminar depozitlerdir

Yaşlandığımızda Bruch membranı elastin laminada debris birikimi ve ayrıca kollajen tabaka ve RPE bazal laminası arasında drusen birikimi oluşmaya başlar. Bu debris birikimi Bruch membranının geçirgenliğinde azalmaya sebep olur. Bu RPE tarafından gözün içinden dışına atık maddelerin pompalanmasına engel olarak RPE dekolmanına sebep olabilir. Ayrıca kuru tip YBMD'de görülen atrofi de yine Bruch membranındaki artık madde birikimi nedeniyle oluştuğu düşünülmektedir(28).

Yaşlanma ayrıca Bruch membranındaki elastin tabakada incelmeye ve kırılmalara yol açar bu tabakada incelme antianjiojenik proteinlerin azalmasına bağlı olarak neovaskularizasyon riskini artırır. Ayrıca elastin yıkım ürünlerinin kendileri de

anjiojeniktir. Bu nedenle Bruch membran elastinlerinin yıkımı sadece neovaskülarizasyona karşı olan bariyerin azalmasına sebep olmaz aynı zamanda damar büyümesini de stimüle eder(29).

Koroidal kan akımı: Yaşlanma ile sklera, Bruch membranı ve damar yapılarının duvarlarına lipoit maddelerin infiltrasyonu sonucu koroidde kan akımına karşı artmış bir direnç izlenmektedir. Bunun sonucu olarak da göz ve beyin arterindeki göreceli dirence bağlı olarak koroid perfüzyon basıncında azalma veya koriokapiller damar içi basınçta artma izlenir.

Ramrattan ve ark. çalışmasında doğumdan (200µm) 90 yaşına kadar (80µm) koroid kalınlığında progresif bir azalma izlenmiştir. Yaşla beraber koriokapillaris yoğunluğu ve lumen çapı azalmaktadır(30).

Bu bilgilerin ışığında subfoveolar koroidal kan akımının yaşla birlikte azalması sürpriz değildir(31). Örneğin 50 yaşın üzerindeki bireylerde indosiyanın yeşille koriokapiller dolma gecikmiş, YBMD hastalarında makülada hipofloresan alanlar görülmeye başlanmıştır.

Submaküler koriokapillarisin Laser Doppler Flowmetrisi 46 yaşından büyük bireylerde düşük koroidal kan akımını ve volümünü göstermiştir(31).

Guymer ve ark Bruch membranındaki endotelial hücre çıkıntılarının Bruch membranından atık temizlemede önemli bir rolü olduğunu söylemektedir. Bu nedenle yaşa bağlı koriokapiller kaybı Bruch membranı kalınlığının artmasının sebebi olabilir (32). Aynı zamanda RPE normal koriokapiller yoğunluğu ve anatomisini koruyucu maddeler üretmektedir. Bruch membran kalınlaşması koriokapillaris bu maddelerin yayılmasını bozarak yaşa bağlı koriokapiller değişikliklere yol açar(33).

Koroid perfüzyonunun azalması RPE metabolizmasını etkileyerek RPE dejenerasyonuna ve atrofisine neden olmaktadır(34,35).

Aynı zamanda artmış koroid basıncı ise RPE den gelen atık maddelerin atılımını zorlaştırmakta ve Bruch membranında lipoit infiltrasyonunu kolaylaştırmaktadır. Bu

drusen ve bazal laminar birikintilerin oluşumuna yol açmaktadır. Artmış koroid basıncı retina pigment epitel dekolmanının (PED) da nedeni olabilir. Ek olarak sistemik hipertansiyon da koroidde vasküler değişikliklere yol açarak damar intimasında kalınlaşma ve tıkanıklığa sebep olabilmektedir(36,37).

Oksidatif stres: Hücrelerin oksidatif hasarı yaşlanma sürecinde önemli bir rol oynar(38).Yaşla birlikte DNA onarım sisteminde bozukluk, yoğun oksidatif stres ve azalmış antioksidan savunma nedeniyle DNA hasarı artar(39).

Fotoreseptör ve RPE gibi nonproliferatif postmitotik hücreler hücre döngüsü kontrol noktalarında herhangi bir DNA hasarı tespit sistemlerine sahip olmadıkları için oksidatif hasara duyarlıdır(40).

Makülada predominant fotoreseptörler koni hücreleridir. Rodlardan daha fazla enerji üretmeye ihtiyacı olduğu için aynı zamanda daha fazla oksijene de ihtiyaç duyarlar(41,42).

Retina görünür ışığa maruz kalmasından dolayı yüksek oksijen tüketen bir organdır. Bu nedenle retina oksidatif strese karşı duyarlıdır(43,44).

Işığa ve oksidatif strese maruz kalma durumu protein, lipid ve DNA'da lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır(45).

Ayrıca bazı çalışmalar antioksidan vitaminler olan vitamin A,C ve E'lerden zengin gıdalar tüketenlerde YBMD riskinde azalma göstermiştir(46,47).

Ek olarak Eye Disease Case Control Study düşük plazma C vitamini düzeylerinin artmış YBMD riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir(48).

YBMD'de plazma glutatyon redüktaz seviyeleri anlamlı derecede düşük izlenmiştir. (49).

Yine bir çalışmanın sonucu sigara kullanmanın da oksidatif hasara yol açarak YBMD için risk faktörü olduğunu göstermektedir(50).

İnflamasyon: Epidemiyoloji ve laboratuvar çalışmaları, enflamasyonun drusen ile YBMD patogenezinde rol aldığını göstermektedir(51,52,53,54). YBMD'yi tahrik eden ana patolojik değişiklikler enflamasyon, oksidatif stres ve endoplazmik retikulum (ER) stresidir(55).Hipoksi ile indüklenbilir faktör (Hif) -1 α , oksijen gerginliği temelinde VEGF-A gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan hipoksik yanıtın anahtar bir aracıdır(56).

Doku kesitlerinin histolojik incelemelerinde RPE'ye ait hücre atıkları, RPE bazal lamina ve "Bruch" membranı arasında birikip kronik enflamasyon yoluyla drusen oluşturabildiği görülmüştür. Drusen akut ve kronik enflamatuvar cevap oluşturan proteinler amiloid P ve kompleman proteinleri de içerir. Enflamasyon anjiyogenez ile alakalıdır ve ileri YBMD'de neovaskülarizasyonda rolü olduğu düşünülmektedir(51-54).

Kuru tip YBMD'nin anlamlı belirtisi olan drusen; apolipoprotein E, koagülasyon proteinleri, akut faz proteinleri, IgG, kompleman faktörleri gibi çok sayıda pro-inflamatuvar faktörler içermektedir ve lokal inflamasyon YBMD'nin erken patogenezi oluşturur(57).

2.5 YBMD Histopatolojisi

Normal yaşlanmaya bağlı olarak makülada çeşitli değişiklikler meydana gelir. Bunlar; fotoreseptör yoğunluk ve dağılımında azalma, pigment epitelinde ultrastrüktürel değişiklikler, melanin granüllerinde azalma, lipofuskin granül ve artık cisimlerin oluşumudur.

Bazal laminar depozitlerin birikimi yağdan zengin granüler material ve geniş aralıklarla yerleşmiş kollajen fibrillerinin, RPE'nin hücre plazma membranı ve onun bazal membranı arasında birikmesidir.

İlerleyici involüsyonel koryokapiller değişiklikler normal yaşlanma süreci ile ilgili olup YBMD'nin bir parçası olmayabilir. YBMD'ye bağlı değişiklikler ise yaşlanmanın parçası değildir ve neovasküler olmayan ve neovasküler olarak sınıflandırılabilir(17).

Lipofuskin birikimi yaşlanmayla beraber, drusen formasyonu ve lipofuskin oluşumunu hızlandıran çok sayıda metabolit retinada belirmeye başlar. Lipofuskin (LF) hücre yaşlanma faktörü olarak isimlendirilir. Bunlar fotoreseptörlerin eksternal segmentlerinin inkomplet metabolizma ürünleridir. Protein lipid membran sıklığının kaybı sonucu lipozom lipofuskin önce sitoplazmaya sonrasında ekstrasüllüler alana çıkar ve sonunda drusenleri oluşturur(58).

Lipofuskin molekülü hibrid florofor A2-E (toksik vitamin A dimeri) içerir ve fotoreseptör apoptozunda aktif bir rol oynadığı lipofuskin YBMD patogenezinde dahildir(58).

Aşırı düzeylerde, lipofuskin ve A2-E fotoreseptörleri ve koryokapillarisini hasarlar ve coğrafik atrofiye sebep olur. RPE'ye toksik olmanın yanında A2-E'nin kompleman kaskadını aktive ettiği de gösterilmiştir(59-60).

2.5.1 Non-Neovasküler Anormallikler (Kuru Tip YBMD)

Atrofik tip YBMD'de görülen temel lezyonlar; drusen, RPE değişikliği, RPE'nin coğrafik atrofisi ve fokal hiperpigmentasyonudur. Atrofik tip, YBMD'nin %90'ından sorumlu iken ancak hastaların %10'da aşikâr görme azalması meydana gelir. Atrofik tip YBMD'de görme azalması yıllar içinde yavaş yavaş gelişmesine karşın, atrofik tip zamanla eksüdatif tipe dönüşebilir ve ani görme azalması oluşabilir(61).

2.5.2 Drusen

Almanca nodül anlamına gelen, ilk defa 1854 yılında Donders tarafından tariflenen drusen; makula içinde RPE seviyesinde yer alan, genellikle 50 yaşından büyüklerde görülen sarı-beyaz, hafifçe kabarık birikintilerdir. Drusen tipik olarak kollajen, RPE organelleri ve hücre proseslerini kapsayan ekstrasellüler eozinofilik materyallerin fokal

birikimidir ve RPE bazal membranı ile Bruch membranının kollajenez katı arasında yer alır(62-63).Bugüne kadar drusenin oluşumu hakkında çok çeşitli hipotezler öne sürülmüştür fakat genellikle bu birikintilerin RPE kaynaklı olduğu düşünülmektedir(64).Histopatolojik incelemeler drusenin dağılımının koryokapilleris patternine uygunluk gösterdiğini göstermiştir(65-66).

Drusen'de plazma proteinlerinin gözlemlenmesi ,enflamatuar bir yanıt sırasında, immün aracılı, kompleman aktivasyonunun sebep olduğu olduğu mekanik önerilere yol açmıştır. RPE'den gelen sinyaller tarafından tetiklenen olaylar, nedensel olarak drusen oluşumunda yer almaktadır(67).Oksidatif protein modifikasyonları protein çapraz bağları, AGE'ler ve lipitden türetilmiş değişiklikler drusen formasyonunda birincil katalizörler olabilir. Gerçekten de AGE'ler vasküler endotelial büyüme faktör salgılanmasını ve in vivo anjiyogenez uyarır bunun sonucunda da YBMD'de koroidal neovaskülarizasyonda rol oynayabilir (68-69).

Drusen her zaman makula dejeneresansına ilerlemez ve yalnızca normal yaşlanma bulgusu olarak kalabilir. İlerleyici formda aynı hastada zaman içerisinde farklı drusen formları oluşabilir. Hastalığın prognozunda oynadıkları rol açısından sayı, şekil ve büyüklüklerine göre sınıflandırılabilirler.

- Boyuta göre:**
- 1- Küçük drusen: < 63 mikron
 - 2- Orta drusen: 63-124 mikron
 - 3- Büyük drusen: >124 mikron

Klinik görünümüne göre:

Sert drusen: Bruch membranının iç yüzeyinde hyalin materyalin birikimlerinden oluşur. Çapı 63 mikrondan küçük sınırları belirgin sarı-gri renkte görülür.

Sert drusen kümeleri; sert drusen birikimlerinin sıkı bir şekilde bir araya gelmesi ile oluşan ve yumuşak drusen andıran lezyonlardan ibarettir. FFA ve indosiyenin yeşili anjiyografisinde(İCGA) erken ve geç evrede hiperfloresan olarak izlenirler(70).

Yumuşak drusen: Yumuşak drusen, 63 mikrondan büyük, sınırları belirsiz ve farklı büyüklük ve şekildedir. Genellikle birleşme ve kümeler oluşturma eğilimindedir. Histopatolojik olarak diffüz bazal laminer veya bazal lineer depozitlerle birlikte RPE-Bruch membranı kompleksinde yaygın fonksiyon bozukluğunu temsil eder. FFA'da gecikmiş ve hafif bir hiperfloresans gösterirler, drusenin büyüklüğü arttıkça floresansı azalır. İCGA'da tüm fazlarda hipofloresandır. Yumuşak drusenin batı toplumlarında erişkinlerde görülme sıklığı % 13-20 arasında verilmektedir. Hem insidansı hem de prevelansı yaşla ilişkilidir ve KNV gelişmesi açısından büyük risk taşırlar(71-74).

Drusenin gerilemesiyle ilgili bulgular, beyazlığının artması, sınırlarının keskinleşmesi, pigment birikintilerinin oluşması ve kalsifikasyonudur. Drusenin gerilemesiyle incelmış RPE veya fokal jeografik atrofi alanları ortaya çıkar. FFA'da atrofik alanlar hiperfloresan, pigment ve kalsifikasyon hipofloresan olarak izlenir. İCGA'nin erken fazında hiperfloresan olarak başlayan atrofi alanlarının bazıları anjiyografi ilerledikçe tamamen hipofloresan olarak izlenirken, bazıları ise zemin koroid floresansına göre daha hiperfloresan hale geçer.

Retiküler Drusen: Retiküler drusenler FFA'da bulgu vermezler. Histolojik yapısı aydınlatılamamıştır. KNV oluşması için yüksek risklidir(75).

Gerileyen drusen: Drusenin gerilemesi ile ortaya çıkan keskin sınırlı, beyaz, kalsifiye, pigment birikimleri ile seyreden ve bunu zamanla RPE incilmesi veya atrofisinin takip ettiği lezyonlardır. FFA'da RPE atrofisi, pigment kümelerine bağlı pencere defektlerinin olduğu hiperfloresan görünüm verirken kalsifik drusen ise hipofloresan özellik gösterir. Bunlar, İCGA'da hiperfloresans görünüm verirler(76).

2.5.3 Retina Pigment Epiteli Değişiklikleri

Bruch membranının iç katının diffüz kalınlaşmasıyla birlikte klinik olarak tespit edilen yumuşak drusen birlikte RPE değişiklikleriyle birlikte seyredebilir. Bu değişiklikler RPE'nin jeografik atrofisi, RPE'nin nonjeografik atrofisi, fokal hiperpigmentasyon ve bruch membranının distrofik kalsifikasyonudur. Nonjeografik atrofi; başlangıçta fovea dışında beliren, zamanla foveayı da etkileyebilen keskin sınırlı ve alttaki koroidal damarların seçilebildiği RPE'nin fokal atrofisidir. RPE'de geniş atrofi alanları dışında sensoriyal retina ve koriokapillarisin atrofisinin de izlendiği, büyük damar arkadlarını aşmayacak şekilde foveayı da içine alan atrofiler jeografik atrofi olarak tanımlanır. Nonjeografik atrofi FFA'da erken dönemde pencere defektine uyacak şekilde lekeli hiperfloresans özellik gösterirken, geç dönemde hiperfloresans giderek azalır. Jeografik atrofide ise FFA'da erken fazda koriokapillaris atrofisine bağlı hiperfloresans izlenmezken, geç dönemde koroid ve skleranın boyanması nedeniyle hiperfloresans izlenir(77).

2.6 Neovasküler (yaş) YBMD

Yaş tip YBMD'nin kuru tipten ayırt edilmesi, "Bruch" membran/RPE kompleks bütünlüğünün ayrılması neticesinde meydana gelen PED ile olur. Sub-RPE ve subretinal potansiyel boşluklara koryokapiller damarların ilerlemesiyle PED ve eksudatif tip YBMD meydana gelir. PED'in en sık komplikasyonu koroidal neovasküler membrandır (78-79). İnsan retinası vücuttaki en yüksek oksijen tüketimi ve metabolik aktiviteye sahiptir. Retina damarları dış pleksiform tabakaya kadar beslenmeyi sağlarken daha derin tabakaların beslenmesi koroid damarlarından sağlanır. Depozitlerin varlığı büyüme faktörlerini tetikleyebilir. Anjiogenez (Vasküler Endotelial Growth Factor,(VEGF) ve anti- anjiogenez (Pigment Epithelium-Derived Factor, PEDF) faktörleri arasındaki dengenin bozulması koroidal neovaskülerizasyonu tetikler (80).

KNV: Yaş tip YBMD nin en önemli bulgusu KNV'dir. KNV, koroidden yeni damar oluşumdur. Oluşan yeni damarlardan sızan sıvılar, retina tabakalarında ayrılmalara ve rüptürlere, subretinal ve intraretinal kanamalara sebep olmaktadır. Koryokapiller damarlar, "Bruch" membranındaki çatlaklardan geçerek RPE ve "Bruch" membranı arasındaki boşluğa (sub-RPE KNV, tip 1 büyüme paterni), retina ve RPE arasına (subretinal KNV, tip 2 büyüme paterni) veya her iki boşluğa (kombine büyüme paterni) ilerleyebilirler. Tip 1 KNV nin anjiyografik bulgusu okült, tip2 KNV'nin anjiyografik bulgusu klasik tipe karşılık gelir. Tip 1 KNV, yaş tip YBMD için karakteristiktir(78).

Klasik KNV: KNV'nun histolojik olarak gösterildiği ilk anjiyografik tiptir. Aşikâr KNV Bruch membranındaki bir çatlaktan koroid kapillerinin proliferasyonu sonucu, anjiogramın erken fazında, sınırları son derece iyi belirlenen, komşu dokulardan ayırt edilebilen parlak hiperflöresans veren ve giderek flöresein sızması sonucu geç göllenme tarzında çevresindeki subsensoryal retinal alanı sızıntı ile dolduran durumdur. YBMD'lerin %12'si yaş tiptedir ve bunların %13'ü klasik KNV özellikleri gösterir(81).

Okült KNV: Klasik dışı tüm görünümleri kapsayan subretinal pigment epitelyum lezyonudur. Beraberinde eksudatif veya hemorajik belirtiler olması üzerindeki pigment epitelinin veya damarsal etkisiyle değişik görüntüler sergiler(82). FFA'da flöresein

göllenmesinin kesin odağı net olarak izlenmeyebilir. Koroidal flöresansın görülmesini engellemeye yetecek kalınlıkta kanama olması, hiperplastik pigment RPE'nin seröz dekolmanları, KNV'nin yavaş kan akımı veya fibröz doku nedeniyle organize olmuş kabarıklıkta flöresansın blokajına bağlı olarak, KNV sınırlarını maskeleyen özellikler ortaya çıkar(83-84). Makuler Fotokoagülasyon Çalışma Grubu tarafından flöresansın anjiyografide 2 farklı gizli KNV floresans paterni belirtilmiştir. Bu paternler fibrovasküler pigment epitel dekolmanı (PED)ve kaynağı belirsiz geç faz hiperflöresanstır.

2.7Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonunda Tedavi

2.7.1 Non-Neovasküler (Kuru Tip) YBMD Tedavisi

Atrofik tip YBMD tedavisini ve hastalığın ilerlemesi ile eksüdatif tipe dönüşümünün engellenmesini sağlayabilecek kabul edilmiş etkin bir tedavi yöntemi yoktur. Oksidatif stresin azaltılması ya da önlenmesi için antioksidan, vitamin ve bazı minerallerden zengin diyet ve takviye ilaçların kullanımı son yıllarda YBMD profilaksisinde gündeme gelmiştir (85-88).

Bu konuda en temel çalışma olan AREDS'in raporuna göre ilave antioksidan desteğinin YBMD progresyonunu yavaşlattığı bildirilmiştir. Takip süresi ortalama 6.3 yıl olan bu çalışmada 55 yaş üzeri 3640 kişi izlenmiş ve vitamin C, vitamin E, β karoten ile çinko kullanımının ileri evre YBMD'yi plasebo grubuna göre %25 oranında azalttığı gösterilmiştir (85-88). Çalışmada 500 mg vitamin C, 400 IU vitamin E, 15 mg β karoten, 15 mg elementer çinkoya eşdeğer 80 mg çinko-oksit ve 2 mg bakır-oksit günlük olarak tedavi grubuna verilmiştir. Çoğu çalışmada karotenoidlerden β karoten, lutein ve zeoksantin çalışılmış olup, özellikle lutein ve zeoksantin kısa dalga boylu mavi ışık ile UV ışığı absorbe ederek retinal fotooksidatif hasarı azalttığı bildirilmiştir (89). LAST çalışmasında atrofik YBMD hastalarında 10 mg/gün lutein desteğinin makula pigment yoğunluğunu, kontrast duyarlılığı ve görme keskinliğini anlamlı olarak arttırdığı gösterilmiştir(88). Yüksek doz lutein ve zeoksantin sağlam retinada erken YBMD hastalık gelişimine etkisi yokken, geç evre YBMD'ye progresyonun önlenmesinde faydalı olduğu bilinmektedir (90). Karotenoidlerden en çok çalışılan β karotenin yeni çalışmalarda sigara içenlerde akciğer kanseri riskini arttırdığının saptanması ve Blue

Mountain çalışmasında YBMD riskini arttırdığının bildirilmesi üzerine günümüzde kullanımı önerilmemektedir. NHNES (22) raporunda ise erken YBMD gelişiminin önlenmesinde D vitamininin etkisinden bahsedilmektedir AREDS raporunda diyette omega 3 ve 6 yağ asitlerinin alımı üzerinde de durulmaktadır. Blue Mountain ve AREDS çalışmalarında 15.8 mg/gün ve üzeri çinko alımının erken ve geç YBMD sıklığını azalttığı bildirilmektedir (85-91).

Sonuç olarak, erken evre YBMD saptandığında 10 mg/gün lutein ve 500-1000 mg/gün omega 3 alımı önerilebilirken, bir gözde ileri evre YBMD varlığında AREDS tarzında yoğun antioksidan desteği gündeme gelebilir.

2.7.2 Neovasküler (Yaş Tip) YBMD Tedavisi

- 1) Lazer Fotokoagülasyon
- 2) Fotodinamik Tedavi
- 3) Transpupiller Termoterapi (TTT):
- 4) Radyasyon Tedavisi:
- 5) Cerrahi Tedaviler
- 6) Antianjiyojenik Tedavi

YBMD etyolojisinde anjiogenik faktörlerin gösterilmesi ile antianjiogenik tedavi seçenekleri ortaya atılmıştır (92). Vasküler endotelial büyüme faktörü anjiyogenezin güçlü bir sitokin modülatörüdür, hem retinal hem de koroidal yeni damarların büyümesini destekler ve neovasküler YBMD gözlerinde koroidal neovasküler membran gelişimi için

kritik kabul edilir(93).Çok farklı tedavi seçenekleri olmasına rağmen halen kesin ve net bir tedavi seçeneği bulunmamaktadır. İntravitreal anti-VEGF enjeksiyonu, yaş tip YBMD tedavisinde üstün bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Bevacizumab(Avastin), Pegaptanib (Macugen), ranibizumab (Lucentis), aflibercept (Eylea) intravitreal enjeksiyonla uygulanan ilaçlardır. İntravitreal triamsinolon da primer olarak KNV tedavisinde, genellikle FDT'ye adjuvan tedavi olarak kullanılmaktadır(94).Ancak intravitreal triamsinolona bağlı göziçi basınç artışı ve lens kesafeti olma riski anti-VEGF ajanlara göre daha fazla bulunmuştur(95).

Pegaptanib, YBMD anjiyogenezisten sorumlu en önemli faktörler olan VEGF'in VEGF165 patolojik izoformuna bağlanarak anjiyogenezis döngüsünü durdurur. Yarı ömrü 1 gündür. "VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization" (VISION) çalışmasında FDT'den farklı olarak pegaptanibin, YBMD'ye bağlı tüm KNV tiplerine etkili olduğu gösterilmiştir.(96)İlacın etkisinden ziyade uygulama şekline bağlı olarak endoftalmi, vitreus hemorajisi, katarakt ve retina dekolmanı gibi yan etkiler görülebilir(94,97).

Ranibizumab, rekombinant monoklonal antikor teknolojisi ile üretilen, VEGF A'nın tüm izoformlarına bağlanabilen insan anti-VEGF antikor fragmanıdır(94).Yarı ömrü ortalama 21 gündür. "Minimally classic/occult trial of the Anti-VEGF antibody Ranibizumab In the treatment of Neovascular AMD" (MARINA) ve "Anti-VEGF Antibody for the Treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularization in AMD" (ANCHOR) çalışma gruplarında intravitreal ranibizumab enjeksiyonunun neovasküler büyümeyi ve sızıntıyı inhibe ettiği, intraretinal ve subretinal sıvıyı azalttığı, görme keskinliğini arttırdığı rapor edilmiştir. İlaça bağlı serebrovasküler hadise ve miyokard enfaktüsü de bildirilmiştir(94,96,98).

Bevacizumab, insan VEGF-A'nın tüm izoformlarını nötralize etmek için tasarlanmış, monoklonal antikor teknolojisi ile üretilen esasında kolorektal, akciğer ve meme kanserinde kullanılması için 2004 yılında US FDA tarafından ruhsatlandırılmış bir ilaçtır(

93). Aynı zamanda YBMD'ye bağı KNV tedavisinde “endikasyon dışı” olarak kullanılmaktadır. Yarı ömrü yaklaşık 40 gündür.

Aflibercept 2011 yılında FDA tarafından onaylandı. Yeni bir anti-VEGF ajan olan VEGF Trap-Eye, insan IgG1 Fc parçası ile insan VEGF reseptör-1 ve VEGF reseptör-2'nin (VEGFR1 ve VEGFR2) anahtar parçalarından oluşan 115 kDA'luk bir rekombinant füzyon proteindir (99). Bu ilaç, VEGF dimerlerini “bir kapan gibi (trap)” bağlar ve adını buradan alır. Ayrıca, bağlama ve etkin bir şekilde yeteneklidir VEGF-B ve plasental büyüme faktörü 1'i (PGF1) bloke eder(99).

Çin Gıda ve İlaç İdaresi tarafından , son zamanlarda YBMD tedavisi için yeni ajan olarak conbercept onaylandı (100).Conbercept, VEGF ailesi proteinlerinin aktivitesini inhibe eden ve yaş tip YBMD tedavisinde kullanılan genetik olarak geliştirilmiş bir homodimerik proteindir(101,102).

In vitro çalışmalar PDGF'nin anjiyogenez sürecinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir(103). Pegpleranib (Fovista; Ophthotech) bir pegile DNA aptameridir. PDGF-BB ve PDGF-AB homodimerlerine ve heterodimerlerine seçici olarak bağlanır etkileşimlerini kendi tirozin kinaz reseptörleri üzerindeki etkileşimle kesintiye uğratar. Bu reseptörler genellikle yeni oluşan damarları stabilize eden perisitler üzerinden etki eder. Pegpleranib (Fovista; Ophthotech) PDGF'nin perisitler üzerindeki etkisini bozarak, anjiyojenik süreci olumsuz etkiler(104).

Anjiyopietin 2, patolojik retinal neovaskülarizasyon gibi retinal vasküler hastalıklar dahil olmak üzere, proanjiyojenik hastalıklarda artmaktadır. Bu nedenle, hem VEGF'nin hem de anjiyopietin 2 nin seçici nötralizasyonu patolojik oküler vaskülatuar hastalıkları anti-VEGF monoterapisine kıyasla normalleştirebilir(105).Nesvacumab (Regeneron) bir antiangiopietin 2 monoklonal antikorudur ve sadece anjiyopietin 2 yi hedefler, bu yüzden aflibercept ile birlikte kullanılmalıdır. Faz 1 de olan bu çalışmada, nesvacumab-aflibercept kombinasyonunun etkili ve güvenli olduğu kanıtlanmıştır. YBMD'de bir faz 2 çalışması etkinliğini ve güvenilirliğini daha fazla değerlendirmek için şu anda yürütülmektedir(106).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Proteomiks Analizi

Proteomiks genomun tüm protein komplementlerini (proteom) çalışan bir bilim dalıdır. Proteomiks ve proteom terimleri Marc Wilkins ve arkadaşlarınca 1990’larda türetilmiştir. Bu kelimeler tüm bir organizmadaki tüm genlerin kolleksiyonlarını ifade eden genomiks ve genom kelimelerinin yansımalarıdır. Proteomiks, çok genel anlamı ile RNA-protein ilişkisini açıklamaya çalışan, hücre ve dokuları oluşturan proteinlerin ifade bulmaları sırasındaki post-transkripsiyonal modifikasyon ve translasyon sırasında oluşan değişiklikler ile ilgilenen bir bilim dalıdır(107).Hücrede gerçekleşen posttranslasyonel modifikasyonlar normal ve patolojik dokulardaki farklılıkları belirler ve proteinde görülen post-modifikasyonların tümünün bilgisini protein kodlayan bölgelerdeki genomik bilgi tek başına veremez. Bu nedenlerle, genomik çalışmalar her zaman nihai protein ekspresyonu hakkında doğru bilgiler sağlayamaz iken yapılan proteom çalışmaları, hastalık patolojisini ve fenotipini genomik çalışmalardan farklı yollarla ortaya çıkarabilmektedir.

Hastalıkların erken tanısı, risklerin veya tedavi yanıtlarının izlenebilmesi için biyobelirteçlerin keşfi; klinik sonuçları düzeltebilecek yeni tedavilerin geliştirilebilmesi için protein hedeflerinin tespit edilebilmesi klinik proteomiksin temel amaçlarındandır

3.1.1 Biyobelirteçler

Hastalıkların patofizyolojisinin zamanla anlaşılması hastaların başarıyla tedavi edilebilmesini etkileyen en temel faktördür(108). Günümüzde biyolojik örneklerde moleküler yöntemler kullanılarak bir takım belirteçler yardımı ile tanı konulması olağan bir uygulamadır. Hastalıklar için yüksek riskli bireylerin taranmasını, erken tanı konulmasını, prognoz tahminini ve tedavi yanıtının izlenmesi bu belirteçlerin konsantrasyonlarındaki değişikliklerin tespit edilmesiyle mümkün olabilmektedir. Klinik uygulamada kullanılan bu belirteçlerin esas amacı mortalite ve morbiditeyi

azaltmaktır. Biyobelirteçler genellikle monoklonal antikor tabanlı metodlarla tespit edilen veya miktarı ölçülen protein molekülleridir. Ancak günümüzde biyobelirteç olarak kullanılan veya belirteç potansiyeli olan birçok molekül tek başına ideal bir molekülün özelliklerini taşımamaktadır. Teorik olarak her hastalık özgün bir biyobelirteçle ortaya çıkarılabilir ve karakterize edilebilir ve bu belirteçler tek bir molekül olabilir. Başka bir alternatif ise hastalığa özgü bir protein olmak yerine hastalık durumunda posttranslasyonel modifikasyonlarla değişmiş olan bir protein veya proteinler paneli olabilir(109).

3.1.2 Proteom Analizinde Kullanılan Genel Strateji

Örnek hazırlığı proteom analizi için ilk adımdır. Tüm hücre ve doku özütlerinde proteinlerin farklı moleküler kütle, yük, izoelektrik nokta ve çözünürlüğe sahip olmaları örnek hazırlanmasındaki ana problemdir.(110) Ayrıca bu aşamada örnek karmaşıklığının azaltılması da önemlidir. Proteom analizinde ikinci adım analitik protein ayırım teknolojisidir. Analitik protein ayırım teknolojisinde önce kompleks protein karışımlarını belli proteinlere ya da protein alt gruplarına ayrılarak basitleştirir. Daha sonra örnekler arasında karşılaştırma yapılarak protein düzeylerindeki farklılıklar belirlenir. Proteinlerin ayırımı araştırmacıya analizi için spesifik proteinleri hedeflemesini sağlar. İlki sıvı fazda ayırımın yapıldığı metod ve ikincisi ise proteomikte altın standart olup sıklıkla tercih edilen 2D (iki boyutlu) jel elektroforez metodu olmak üzere iki tip metod mevcuttur(110,111). Bunlardan farklı olarak diğer protein ayırma teknikleri 1D jel elektroforezi, poliakrilamid jel elektroforezi 1. SDS- PAGE (denatüre edici page) ve 2.ND-PAGE(non denatüre edici page), HPLC (yüksek performans likit kromatografisi), kapiler elektroforez, izoelektrik odaklama ve kromatografik yöntemlerdir.(110,111) Ayırılmış örneklerin analizi, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight* (MALDI-ToF), ESI-MS (*electrospray ionization-mass spectrometry*), PSDMALDIMS (*Post Source Decay*) ve SELDI-TOF (*Surface Enhanced Laser Desorption Ionization*) yöntemleri ile yapılır. Kütle spektrumu ve kromatogram verileri alınan örnekler için veri tabanında tarama yapılmakta ve belirli olasılıklarla protein eşleştirmeleri elde edilmektedir. MALDI-TOF ile protein bilgisine ulaşıp proteinin adı konulduktan sonra, ESI-MS için kullanılan Q-TOF ile amino asit dizilimlerine ulaşılarak proteinlerin primer amino asit dizileri aydınlatılabilmektedir.

. Veri tabanları üzerinden kimliği belirlenmiş olan proteinler değerlendirilerek farklı tedavi dozlarına yanıt, tedavi edilen ve edilmeyen bireylerdeki protein haritaları veya farklı hastalıkları taşıyan vakalar ile kontrol grupları arasında fark doğrudan ve en güvenilir şekilde ortaya koyulmaktadır.

3.2.MALDI-TOF Kütle Spektrometrisi Analizi

Kütle spektrometre aletleri iyonlaştırılmış maddeleri gaz fazında analiz ederler. Bu nedenle bir kütle spektrometresi iyon kaynağı, kütle/yük oranını belirleyebilen bir kütle analiz cihazı ve bir dedektörden oluşur. Proteinlerin ve biyolojik moleküllerin gaz fazına taşınılabilmesi ESI (*electrospray ionisation*) veya MALDI (*matrix assisted laser desorption/ionization*) teknikleri ile yapılır. MALDI tekniğinde analizi yapılacak maddeler katı bir kristal matriks ortamından lazerle iyonize edilir. Matriksin olmadığı ortamda biyomolekül parçalanacağı için matriksin kullanılması şarttır. İyonlaştırılmış biyomoleküller elektrik alan içerisinde hızlandırılarak bir tüp içerisine aktarılır. İyonların bu tüp içerisindeki hızları her bir iyonun kütle ve yükü ile doğru orantılıdır. Böylece her bir iyonun tüpten çıkış anı sahip olduğu kütle/yük sinyal oranına bağlı olarak değişir.

MALDI-TOF metodu kullanılarak proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin karakterizasyonu ve tanımı mümkündür. Bu metod oldukça duyarlı olup moleküler ağırlıkları 400 ile 350,000 Da arasındaki polipeptidlerin tanımlanmasını sağlar. Elde edilen kütle/yük değerlerinin analizi MALDI-TOF analizinden elde edilen kütle/yük değerleri Swiss-Prot veri bankasında Prospector adı verilen ve ücretsiz ulaşılabilen bir programda araştırılabilir. Bu programın amacı araştırılan proteinin kütle/yük değerlerini bugüne kadar bilinen tüm kütle/yük değerleri ile karşılaştırmak, veri tabanındaki değerlerle eşleşip eşleşmediğini araştırmak ve hangi proteine ait olduğunu tespit etmeye çalışmaktır. Protein prospektör içerisinde birkaç farklı programı kullanmak mümkündür. (Swiss-Prot veri bankası, <http://prospector.ucsf.edu/>)

Bu bağlamda kullanabileceğimiz ikinci bir program da Peptident adı altında sunulan ve ExPasy veri bankası tarafından ücretsiz olarak kullanıma açılan veri tabanıdır (<http://ca.expasy.org/tools/peptident.html>). Oldukça kolay kullanılabilen bir kullanıcı-

ortamına (*interface*) sahip olan bu program elde edilen kütle/yük değerlerini direk olarak veri bankası içerisinde araştırır.

Kısacası proteomiks analizinde kullanılan genel strateji; (1) Ekstraksiyon, solübilizasyon, ön-fraksiyonlama, DNA'nın uzaklaştırılması, yaygın bulunan proteinlerin uzaklaştırılması gibi teknikleri içeren örnek hazırlığı. . (2) Protein ve/veya peptitlerin tanımlanması (identifikasyonu) ve elektroforeze dayalı tekniklerin kullanımındır.

3.3 Karşılaştırmalı Proteomiks Çalışmalarının Amacı

Klinik proteomiks çalışmalarında temel amaç, farklı hastalıklara ait özgün biyobelirteçlerin ortaya konması ve bunun tanı testi olarak kullanılmasıdır. Biyokimyasal mekanizmaların karmaşıklığı nedeni ile birçok hastalıkta tek bir biyolojik belirteç ile sonuca ulaşılamamaktadır. Bu nedenle hastalık progresyonu sırasında ortaya çıkan moleküllerin çalışılmasında, çoklu belirteç panellerinin veya proteomiks panellerinin çalışılması giderek önem kazanmaktadır(112,113).

Normal biyolojik süreçlerin ve hastalıkların altında yatan mekanizmaların tanımlanması, vücut sıvılarında, hücrelerde veya doku biyopsilerinde diyagnostik ve prognostik hastalık belirteçlerinin tanımlanması, hastalık progresyonunun izlenmesi ve subklasifikasyonu, yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesi, vücut sıvı örneklerinin veya doku biyopsilerinin orijinlerinin belirlenmesi, sıvı, hücre veya dokularda protein fenotiplerinin ve post-translasyonel modların belirlenmesi, immünoglobulin klonlarının araştırılması genetik otoimmün, enfeksiyonel veya neoplastik hastalıklar olarak tanımlanabilir.

3.4 Deneyin Uygulanışı

Çalışma Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' nın katkıları ve Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun izni ile gerçekleştirildi. Çalışma Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Retina departmanında Mayıs 2016 – Ocak 2018 ayları arasında hasta grubu olarak Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu tanısı konulan ve daha önce

enjeksiyon olmamış intravitreal enjeksiyon endikasyonu alan 13 hastanın 13 gözü çalışmaya alındı. Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu tanısı fundus muayenesi, OKT ve FFA ile desteklenerek konuldu. Bu hasta grubu intravitreal enjeksiyon yapıldıktan sonra göziçi basıncı artma riski olan hastalardan vitreus ponsiyonu yapılarak göziçi basıncı dengeleme isteği de mevcuttu. Vitreus boşluğuna intravitreal tedavi ile ek sıvının verilmesi göz içi basıncında ani yükselmeye neden olabilir. İntravitreal anti-VEGF tedavisinden sonra bu geçiçi kısa süreli GİB yükselmesi (30 dk ya kadar devam eder) birçok yazar tarafından incelenmiştir(95).

11 hastanın 11 gözü de kontrol grubunu oluşturmaktaydı. Kontrol grubuna herhangi bir sistemik ve retinal hastalığı olmayan sağlıklı grup hastalar alındı. Katarakt cerrahisi sırasında arka kapsülü açılan hastalardan vitreus öneği alındı. Kontrol grubuna dahil edilmeme kriterleri, üveit atağı geçirme bulgusu, glokom, yaşa bağlı makula dejenerasyonu, retinal arter ya da ven oklüzyonu, hipertansif retinopati, diyabet tanısı ve daha önce vitreoretinal cerrahi geçirmiş olan hastalar kontrol grubuna alınmadı.

Hastalardan vitreustan örnek alma biçimi, intravitreal enjeksiyonların uygulanış biçimi, beklenen etkisi ve olası komplikasyonları hakkında bilgilendirildi ve işlemin gerçekleştirilmesi için bilgilendirilmiş onam formları alındı

Hastaların enjeksiyon öncesindeki sistemik ve oftalmolojik hikayeleri kaydedilip, enjeksiyon öncesinde ve enjeksiyon sonrası 1.gün, 1.hafta, ve aylık kontrollerinde oftalmolojik muayeneleri yapıldı. Snellen eşeli kullanılarak en iyi düzeltilmiş görme keskinliği ve yarıklı ışık biomikroskopisi ile muayeneleri yapılarak ön segment bulguları değerlendirildi. Goldmann applanasyon tonometresi ile göz içi basınçları ölçüldü. Tropikamid ve fenilefrin damla ile pupiller dilatasyonun ardından 90 D lens ile detaylı fundus muayeneleri yapıldı.

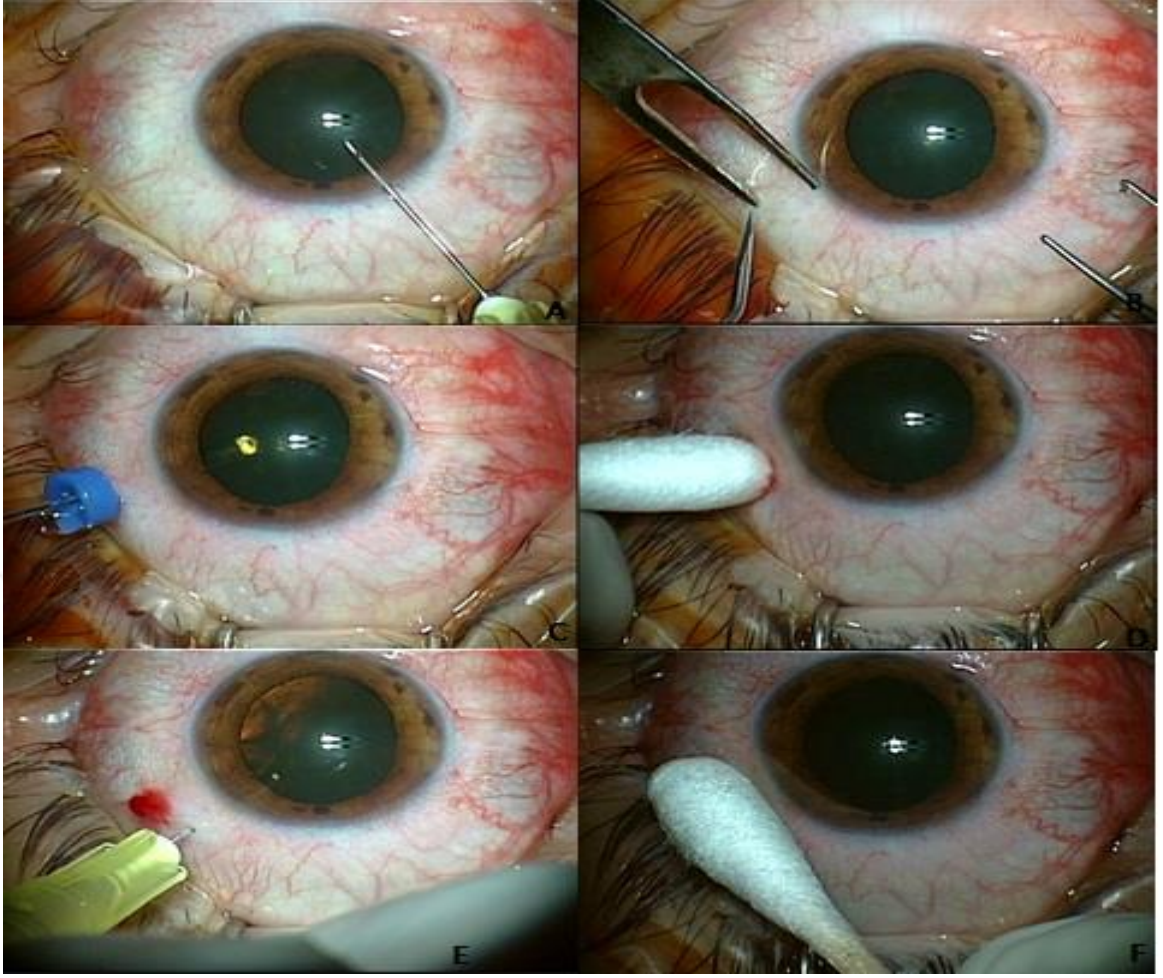
3.4.1 Örnek Alınma Biçimi ve Enjeksiyon Tekniği

Tüm müdahaleler ameliyathane koşullarında yapıldı.Kontrol gruplarında peribulber anestezi den sonra göz kapakları ve çevresi %10' luk povidon-iyodin emdirilmiş steril gazlı bezle silindi. Kurulandıktan sonra steril drape örtüldü. Katarakt cerrahisine başladıktan sonra işlem esnasında komplikasyon sonucunda arka kapsülü açılan hastalardan transkonjunktival 23 gauge sklerotomi açılarak, okütomun aspirasyon ucuna

enjektör takılmış bir vaziyette vitreus örneği(yaklaşık 0,5-0,6 mL) alındı. Bu işlemlerin hiç birinde ön kamara koruyucu ve infüzyon kullanılmadı. Ardından rutin cerrahi prosedüre devam edildi

Çalışma gruplarında 1cc(lidokain+bupivakain karışımı) peribulber anestezi den sonra göz kapakları ve çevresi %10' luk povidon-iyodin emdirilmiş steril gazlı bezle silindi. Kurulandıktan sonra steril drape örtüldü. Steril kapak ekartörü yerleştirildikten sonra göz yüzeyine %5' lik povidon- iyodin dökülerek 3 dakika bekletildi ve ardından steril izotonik solüsyonla yıkandı. Transkonjunktival 23 gauge sklerotomi açılarak, okutomun aspirasyon ucuna enjektör takılmış bir vaziyette 0,5 mL vitreus örneği alındı. Bu işlemlerin hiç birinde ön kamara koruyucu ve infüzyon kullanılmadı. Örnek alındıktan sonra ön kamara giriş yeri sızdırmadığından emin olunduktan sonra, transkonjunktival sklerotomi trokarı çıkarılıp pamuklu çubuk ile basınç uygulandı. Sklerotomiden sızdırma olmadığından emin olundu. Ardından, fakik gözlerde limbustan 4 mm, pseudofakik gözlerde limbustan 3.5 mm uzaklık pergelle işaretlendi. . Giriş yeri olarak üst temporal kadrant tercih edilmeye çalışıldı. 30 gaugelik iğne ile pergelle belirlenen noktadan merkeze doğru 0.5 mg ranibizumab yada aflibercept enjekte edildi. Enjeksiyon sonrası iğne geri çekildikten hemen sonra ilacın geri sızmasını ve konjonktiva kanamasını önlemek için enjeksiyon yerine steril pamuklu çubuk ile kısa süreli hafif basınç uygulandı. Enjeksiyondan hemen sonra gözün tonüsü dijital olarak kontrol edildi ve ışık hissinin olup olmadığı sorgulandı. Tüm hastaların gözü antibiyotikli pomad ile kapatıldı ve 1 hafta kullanmak üzere antibiyotikli damla verildi. Ani görme azalması, ağrı, kızarıklık gibi şikayetlerinin olması durumunda acile başvurmaları konusunda uyarıldı. Hastalar ertesi gün kontrole çağrılarak biomikroskopik muayene ile enfeksiyon açısından ve ani göz içi basınç artışı açısından muayene edildi.

Alınmış örnekler steril ependorf tüplerine yerleştirildikten sonra, -80 derecelik sıvı azot tankında dondurulup, -80 derecede buzdolabında bekletildi. Örnekler hep aynı cerrah tarafından alındı. Hiçbir operasyonda komplikasyon gelişmedi.



Şekil 2 : vitreus örneği alınması ve intravitreal enjeksiyon tekniği (A) 23 gauge transkonjunktival sklerotomi açılacak yerin pergelle işaretlenmesi, (B) okütöm yardımıyla vitreus örneği alınması, (C)trokar çıkarıldıktan sonra sklerotomi üzerine basınç uygulanması, (D) intravitreal enjeksiyon yapılması, (E) enjeksiyon yerine basınç uygulanması

3.5 Proteomiks Değerlendirmesi

3.5.1 Örneklerden Protein Özütlerinin Hazırlanması

Vitröz sıvısı ve retina örneklerinden protein özütleri DIGE tamponu (7 M Urea, 2 M Thiourea, 30 mM Tris, and 5 mM $Mg(CH_3COO)_2$, pH 9) içerisinde hazırlandı. Örneklerin homojenizasyonu sırasında protein yıkımını engellemek için proteaz

inhibitör karışımı eklendi. Homojenize edilen örneklerden proteinleri içeren sıvı kısmı elde edebilmek için örnekler önce +4°C'de 10.000xg'de 10 dk santrifüj edildi, oluşan sıvı üst faz temiz yeni tüpe alınarak örnekler tekrar 4°C'de 20,000xg'de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda iyice temizlenen protein içeren supernatant dikkatlice pipet yardımıyla alınarak Lo Binding tüpler içerisine aktarıldı.

3.5.2 Protein Konsantrasyonunun Tayini

Örnekler kullanılmak üzere -80°C'de saklama öncesi protein konsantrasyonlarının ölçülmesi gerekmektedir. Protein konsantrasyonları hazırlanan standartlar ve gerekli örnek dilüsyonları kullanılarak Bradford metodu ile belirlendi ve tüpler üzerine konsantrasyonlar yazılarak örnekler hızlı dondurma sonrası -80°C'de saklandı.

3.5.3 Protein Örneklerinin Odaklanmaları ve 2D Jel Elektroforezleri

Protein örneklerine ilk aşamada IPG stripler üzerine geçebilmeleri için striplerle birlikte rehidrasyona tabi tutuldu. İzoelektrik odaklamada öncül denemeler için 7cm'lik IPG stripler (pH 3-10 NL), analizler için ise 17 cm'lik IPG stripleri (pH 5-8 NL).). Bu aşamada 7cm IPG stripler için 100 µg, 17cm IPG stripler için ise 750 µg protein örneği kullanıldı. Gerekli miktardaki protein örneği 2D rehidrasyon tamponu ile karıştırılıp içerisine stripin pH'sına uygun %1 Amphylote ve %1 TBP eklendi. Bu aşamadan sonra protein örnekleri fokuslama trayleri içerisine konuldu ve örneklerin üzerlerine uygun IPG stripler dikkatli bir şekilde yerleştirilerek 50µA/IPG Strip akım uygulanacak şekilde PROTEAN IEF (BioRad) içerisinde aktif rehidrasyona tutuldu (20°C). Aktif rehidrasyon sırasında 1. saatin sonunda örneğin buharlaşmasını önlemek için IPG striplerin üzerilerine 2-3 ml mineral yağı ilave edildi ve yaklaşık 16 saat rehidrasyon işlemine devam edildi.

Rehidrasyon işleminden sonra IPG striplerin izoelektrik odaklamasına geçildi. Rehidrasyon sonunda IPG stripler alınarak üzerlerinde fazla miktarda bulunan yağ kurutma kağıdı ve su yardımı ile temizlendi, ardından temiz bir fokuslama trayi içerisine konularak üzerlerine yeni mineral yağ eklendi. Trayler daha sonra yine PROTEAN IEF (BioRad) içerisine konularak adım adım akımı yükselten üç aşamalı bir program ile 20°C'de fokuslandı (7cm'lik IPG stripler için S1:250V 20 dk Linear, S2: 4000V 2 saat

Lineer, S3: 4000volt, 10000 V-saat, Rapid, toplam 5 saat 14000 V-saat. 11cm'lik IPG stripler için S1:250V 20 dk Linear, S2: 8000V 2.5 saat Lineer, S3: 8000volt, 20000 V-saat, Rapid, toplam 5.3 saat ~30000 V-saat. 17cm'lik IPG stripler için S1:250V 20 dk Linear, S2: 10000V 2.5 saat Lineer, S3: 10000volt, 40000 V-saat, Rapid, toplam 7 saat ~50000 V-saat.). Fokuslama sırasında proteinler ait oldukları izoelektrik noktalarına göre IPG strip üzerinde sıralanırlar.

Fokuslama sonrasında stripler tampon I (6M üre, 0.375M tris-HCL pH8.8, 2% SDS, 20% gliserol, 2% (w/v) DTT) ve tampon II (6M üre, 0.375M tris-HCL pH8.8, 2% SDS, 20% gliserol, 2% (w/v) iodoasetamid) içerisinde 30 dk'lık sürelerle yıkandı. Stripler bu aşamadan sonra hazırlanan veya precast olarak alınan poliakrilamid jellere (12% veya değişik konsantrasyonlarda) yerleştirilerek elektroforez (7 cm'lik stripler için Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad) kullanılarak ve 17 cm'lik stripler için Dodeca Cell (Bio-Rad) kullanılarak 35mA 30 dk, 48mA 5 saat 16°C'de) ile moleküler büyüklüklerine (MW) göre ikinci boyutta (2D) ayırma tabii tutuldu [Laemmli vd. 1970]. İkinci boyutta ayırım sırasında kullanılacak jeller için jel jel farklılığını ortadan kaldırmak amacıyla çoklu örnek çalışmalarında 17cm'lik stripler için DODECA (BioRad) jel dökme, jel yürütme ve boyama sistemi kullanıldı.

Elektroforez sonrasında jeller 40% metanol, 10% asetik asit içerisinde en az bir saat fikse edildi ve ardından laboratuvarımızda üretilen Murafast colloidal Coomassie mavisi boyası içerisinde gece boyu boyandı. Jellerin görüntülenmesi VersaDoc sistemi (BioRad) ile yapıldıktan sonra jellerin analizleri PDQuest Advanced programı ile yapılarak istatistiki olarak anlamlı olan spotların kesimi Spot-cutter robotu (BioRad) ile yapıldı.

3.5.4 In-Gel Tripsin Kesimi ve Zip-Tip C18

Protein spotlarından peptidlerin elde edilebilmesi için proteinlerin jel içerisinde peptidlerine ayrılması ve ardından jelden izole edilmeleri gerekmektedir. Bu işlem için spot örnekleri %50 asetonitril (ACN) ve %50 25 mM amonyum bikarbonat çözeltisi içerisinde destain edilerek çalkalamalı vorteks üzerinde yıkanır. Yıkama sonunda örnekler 25mM amonyum bikarbonat içerisinde 10% TCEP olacak şekilde 60°C'de 10 dk disülfid bağlarının kırılması sağlanacak reducing edilir. Ardından son konsantrasyonu

100 mM iyodaasetamit (IAA) olan 25mM amonyum bikarbonat içerisinde oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat bekletilerek indirgenmiş olan sistin yan zincirlerinden metillenecektir (Alkylation). Bu işlem sonunda %100'lük ACN içerisine alınan spotlar, ACN uzaklaştırıldıktan sonra son konsantrasyonu 10ng/μl olan tripsin ile 30°C'de gece boyu kesime alınır. Örneklerin Zip-Tip'leri uçların önce ACN ve 0,1% triflorik asit ile dengelenmesi ile başlar. Her örnek 25-30 defa pipetlendikten sonra MALDI matris ile MALDI plate üzerine elüsyonu yapılır.

3.5.5 MALDI TOF-TOF Analizi

Zip-tip sonrası MALDI plate yerleştirilen örneklerin AbSciex 5800 MALDI-TOF-TOF (MS/MS) cihazında analizleri yapıldı. MALDI-TOF-TOF bir kütle spektrometresi olup lazer ışığı kullanarak iyonize ettiği peptitleri vakumlu bir tüp içerisinde ayrıştırdıktan sonra kütle/yük (m/z) oranlarına ve peptitlerin amino asit dizilimlerine göre tanımlamaya yardımcı olur. Cihazdan elde edilen veriler online MASCOT data bankasından Protein Pilot programı kullanılarak hangi proteine ait oldukları belirlenir.

MALDI kalibrasyonu eksternal veya internal kalibrant kullanılarak yapılacak, her bir spektrum için ortalama 200 lazer vuruşu kullanılacaktır. Elde edilen tüm spektralar (m/z), arama parametreleri; bir hatalı kesim bölgesi, fiksed modifikasyon olarak carbamidomethyl (cysteine), değişken modifikasyon olarak Met oksidasyonu, peptid yükü +1, monoizotopik kütle değerleri, peptid kütle toleransı ± 50 ppm, fragment kütle toleransı ± 0.25 Da olarak belirlenerek MASCOT bilgi bankasında analiz edildi.

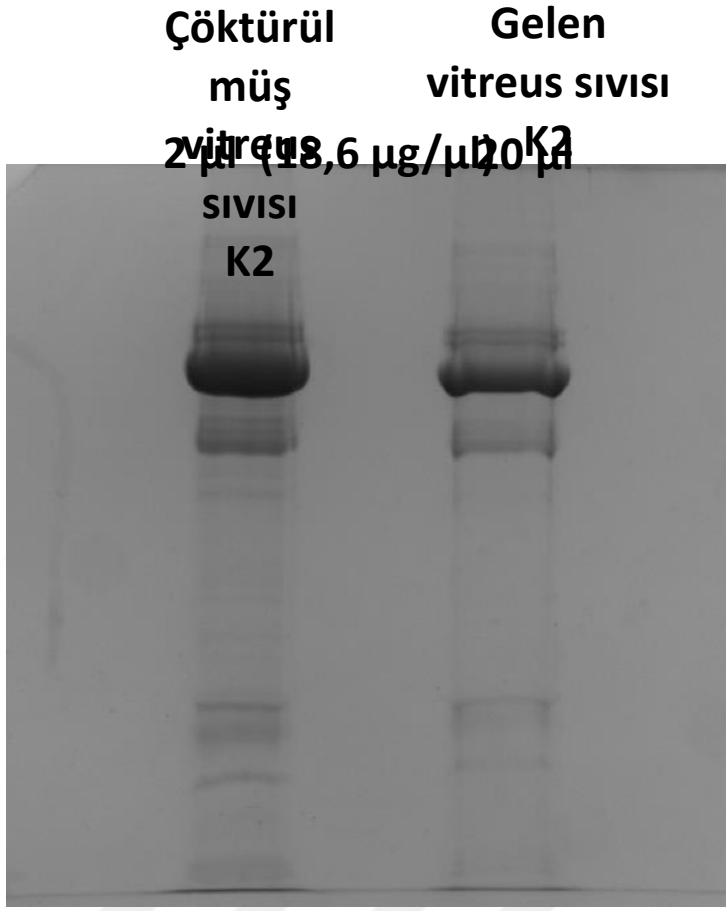
3.5.6 Biyoinformatik Analizler

Tanımlanan proteinler arasındaki biyolojik ilişkiyi ortaya koymak ve hücrel yolakları belirlemek için ise Panther ve String programları kullanıldı. Bu programların her ikisi de internet üzerinden ücretsiz olarak kullanılabilen programlar olup <http://www.pantherdb.org/> ve <https://string-db.org/> web adreslerinden ulaşılabilir. Tanımlanan proteinlerin etkileşim yolları ve etkileştiği proteinleri belirleyebilmek için ise yine internet üzerinden ücretsiz ulaşılabilen BioGrid analizi gerçekleştirildi

(<https://thebiogrid.org/>). Tez içerisinde kullanılan tüm şekiller Adobe Illustrater CS6 programı ile yapıldı ve en az 300 dpi çözünürlükte oluşturuldu.

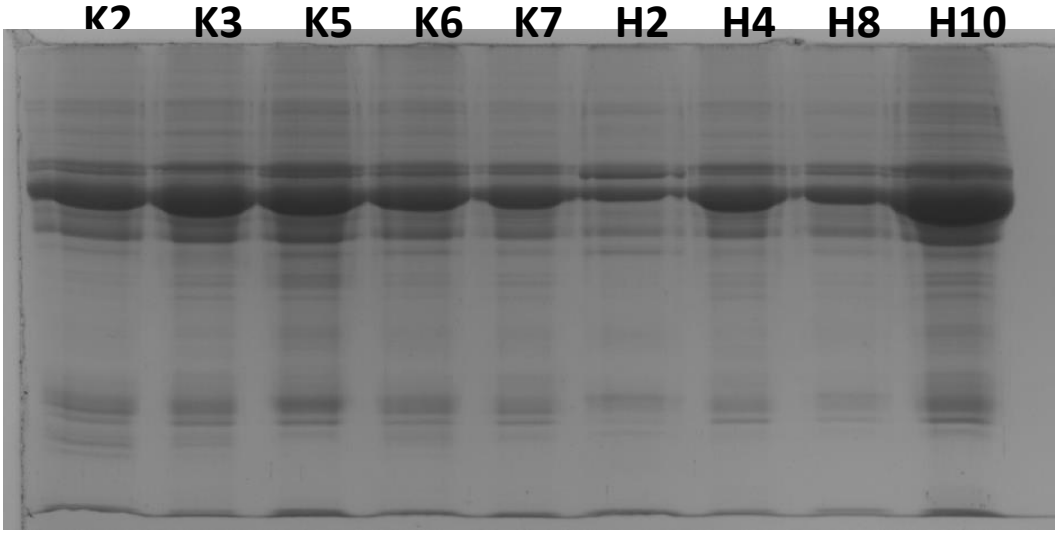
4.BULGULAR

Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu tanısı konan 13 hastadan ve herhangi bir sistemik ve retinal hastalığı olmayan kontrol grubunu oluşturan 11 sağlıklı bireyden alınan vitreus sıvısı örnekleri uygun şartlar altında DEKART-Proteomik Araştırma Laboratuvarına ulaştırıldı. Vitreus örneğinin %95'ini su ve %5'lik kısmını ise hiyaluronik asit ve proteinler oluşturmaktadır. Bu nedenle gelen örneklerden protein özütü hazırlanmadan önce, hacimce en fazla olan ve kontrol grubuna ait bir örnekten protein miktarı Bradford metodu kullanılarak ölçüldü. Protein konsantrasyonunun çok düşük olması nedeniyle ölçüm yapılamadığından yüksek hacimde örneğin çöktürülmesi ve çökeltinin DIGE tamponu içerisinde tekrar çözülmesi sağlanarak konsantrasyonun artırılması ve örneğin temzilenmesi sağlandı. Çöktürülmüş ve çöktürülmemiş örneklerden bir boyutlu (1D) jel elektroforezi yapılarak örnek kalitesi ve miktarı kontrol edildi (**Şekil1**) Şekilde görüldüğü gibi çöktürme sonrasında protein konsantrasyonun arttığı gözlemlendi.



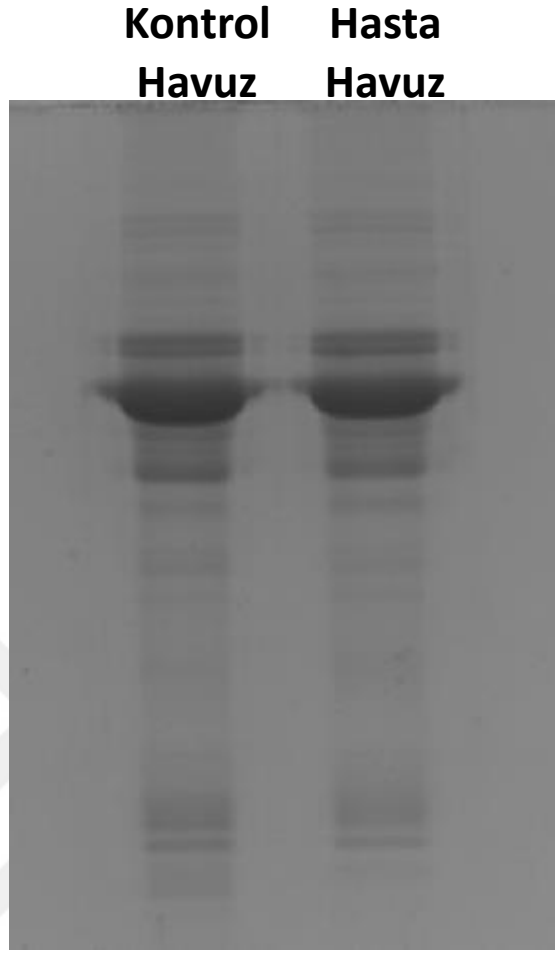
Sonuçlar Şekil 3. Kontrol grubuna ait K2 vitreus örneğinin çöktürme sonrası ve öncesi bir boyutlu jel elektroforezi görüntüsü

Çöktürülmüş örneğin örnek kalitesinin ve protein miktarının daha iyi olması nedeniyle tüm örneklerin bu şekilde hazırlanmasına karar verildi. Yapılan Bradford ölçümleri sonucunda özellikle hasta grubuna ait örneklerin hacimlerinin ve protein konsantrasyonlarının çok düşük olduğu görüldü (**Şekil 3**).



Sonuçlar Şekil 4. Kontrol ve hasta grubuna ait vitreus örneklerinden çöktürme sonrası bir boyutlu jel elektroforezi görüntüsü. K2, K3 ve K5 örneklerinden 20 µg, K6 ve K7 örneklerinden 10 µg, H2'den 9 µg ve H4, H8 ve H10 örneklerinden 1 µl örnek yüklenmiştir. (K: Kontrol, H: Hasta)

Yapılan 1D-jel elektroforezi çalışmalarında hem hasta hem de kontrol grubunun örnek miktarları ve konsantrasyonlarının çok düşük olması nedeniyle, iki boyutlu (2D) jel elektroforezi çalışmalarında kullanılacak protein havuzlarının örnek konsantrasyonuna göre değil hacime göre oluşturulmasına karar verildi. Örnek havuzları oluşturulurken hacimce en az olan örnek baz alınarak oluşturuldu. Bradford yöntemiyle protein havuzlarının konsantrasyonu ölçüldükten sonra 1D-jel elektroforezi yapılarak ölçümümüz onaylandı (Şekil 4). Deney sonucunda oluşturulan hasta ve kontrol grubu protein havuzlarının eşit miktarda protein içerdiği görüldü. Yapılan bu öncül analiz, örneklerin karşılaştırmalı 2D-jel çalışmalarına uygun olduğunu ve elde edilecek bilgilerin güvenilir olacağını gösterdi. Toplamda yaklaşık olarak 3000 µg protein içeren havuzlar çalışmanın sonuna kadar kullanılacak şekilde parçalar ayrıldı ve -80°C'de saklandı.



Sonuçlar Şekil 5. Kontrol ve hasta havuzu örneklerinin bir boyutlu jel elektroforezi görüntüsü. Her kuyucuğa 10 µg protein yüklenmiştir

2D Jel elektroforez çalışmaları

Protein örneklerinin hangi odaklama aralığında çalışılacağını belirleyebilmek için, 7 cm boyutunda pH 3-10 aralığında lineer striplerde bir ön çalışma yapıldı (**Şekil 6**). Yapılan bu ön çalışma neticesinde örneklerin 11 cm'lik geniş jellerde ve pH 3-10 aralığında çalışılmasının uygun olacağı sonucuna varıldı. Bu amaçla metod kısmında anlatıldığı gibi her bir örnekten ikili tekrar olacak şekilde 900 µg protein kullanılarak 2D-jeller üretildi. Üretilen jeller Mura-fast boyası ile boyandı, VersaDoc MP4000 sistemi ile görüntülendi ve görüntüler PDQuest Advance yazılımı ile analiz edildi (**Şekil 7**.) Yapılan analizler jeller üzerinde ortalama 148 adet protein spotunun bulunduğunu gösterdi (**Şekil 8**.) Jeller arası eşleşme oranının %98 olduğu görüldü. Kontrol grubu

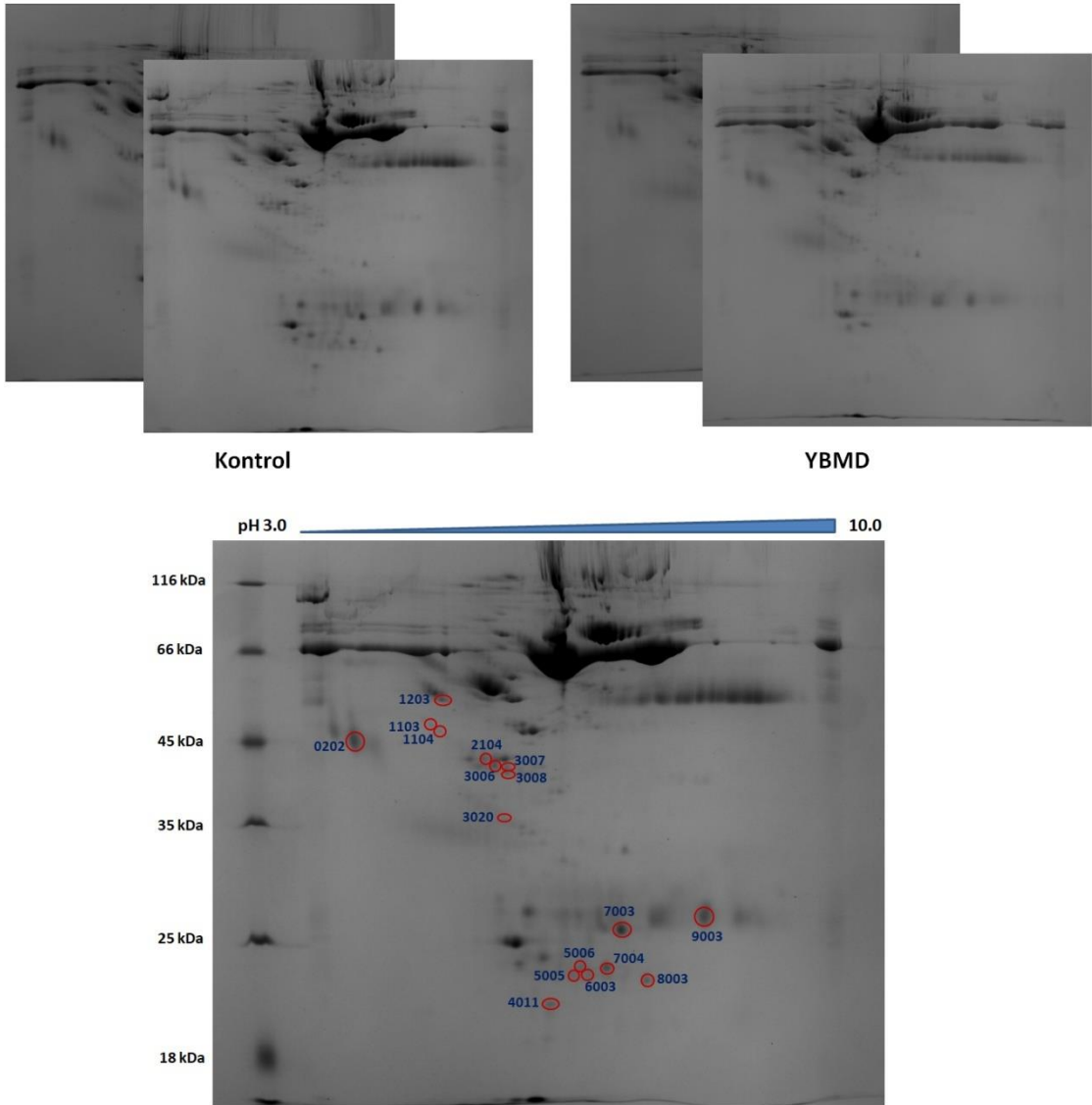
içinde yapılan analizde varyasyon katsayısının 25.67, YBMD grubu içerisinde ise 22.65 olduğu bulundu. Bu rakam jellerin protein profillerinin genel manada birbirine çok benzer olduğuna işaret etmektedir



Sonuçlar Şekil 6. 2D jel görüntüsü: pH3-10 aralığında protein dağılımını ve sayısını belirlemek amacıyla yapılmış 7cm'lik 2D jel görüntüsü. (M: Unstained Protein Molecular Weight Marker, ThermoScientific, CatNo26610)



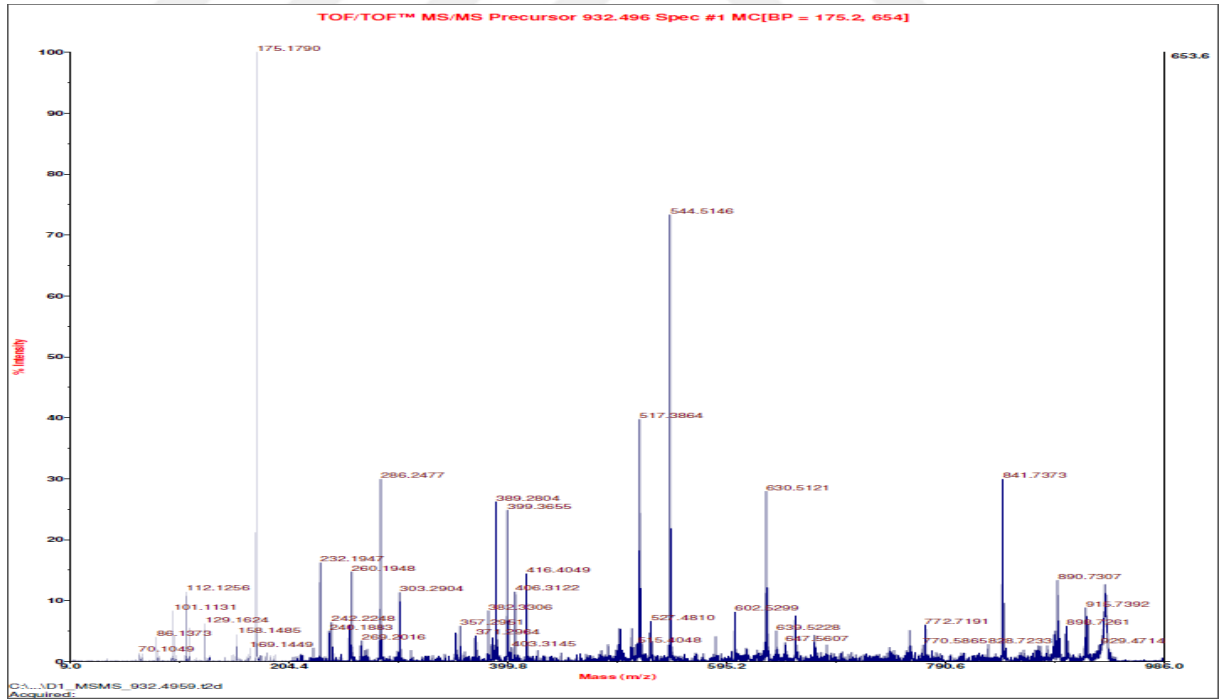
Şekil 7. 11 cm'lik geniş jellerde ve pH 3-10 aralığında çalışılmış jellerin PDQuest Advance yazılımı ile analizi



Şekil 8. Her bir grup için elde edilen 2D jel görüntüleri ve regülasyon görülen ve kesilip tanımlanan proteinlerin jel üzerindeki pozisyonları

Jellerin görsel analizi örneklerin protein aralığının hem yüksek hem de düşük moleküler ağırlıkta proteinler içerdiğini gösterdi. Bazı protein spotları diğer spotlara göre baskın bir görüntü verdi ve bu spotların daha büyük moleküler ağırlıklı proteinlerden oluştuğu görüldü. Ancak bu protein spotlarının jel üzerindeki dağılımları homojen olmadığı için bu spotlar arasındaki karşılaştırma sağlıklı sonuçlar vermedi ve bu nedenle bu spotlar tanımlanmadı. Yapılan analizde jel üzerindeki diğer spotların regülasyon oranlarının sağlıklı bir şekilde hesaplanabileceği görüldü ve karşılaştırmalı analizler bu spotlar ile yapıldı. Toplamda 17

protein spotunda en az 2 kat regülasyon olduğu görüldü. Bazı proteinler seçici olarak sadece kontrol grubunda gözlemlendi. Bu spotlar, tanımlanmak amacı ile jellerden otomatik spot cutter cihazı ile kesildi ve jel-içi tripsin ile kesilerek peptidlerine ayrıldı. Ayrılan peptidlerin kütle/yük (m/z) oranları MALDI-TOF/TOF cihazı ile belirlendi (Şekil 9). Belirlenen m/z oranları MASCOT yazılımı aracılığı ile protein tanımlamada kullanıldı. Tanımlanan protein listesi tablo 1’de verilmiştir. Tablodaki protein skorları incelendiğinde SSP 1103, SSP 1104, SSP 3007, SSP 7004 ve SSP 9003 numaralı spotlar hariç tüm spotların yüksek güvenilirlikle tanımlandığı görüldü. Bir proteinin istatistiksel olarak doğru tanımlanabilmesi için protein skorunun 100’ün üzerinde olması gerekmektedir. Ancak protein skoru düşük olan protein tanımlamalarında eğer bir iyon skoru elde edilmişse bu tanımlamanın da büyük ihtimale doğru olduğunu gösterir. Çünkü iyon skoru olan peptidler kütle spektrometresinde dizilenmiş ve amino asit içerikleri belirlenmiş demektir. Tablo 1’de verilen düşük skorlu beş protein için de dizi bilgisi elde edilmiş ve bu proteinlerin doğru tanımlandığı gösterilmiştir.



Şekil 9. MALDI-TOF/TOF spektrum görüntüsü

Tablo 1. MADLDI-TOF/TOF analizi sonrasında tanımlanan protein spotlarına ait veriler

Spot No	AC no.	Best Protein Acc.	Best Protein Mass	Best Protein Score	Expect	Matches	Calc pI	Seq. Cov. (%)	Best Protein Description	Ion score Observed	Mr (calc)	Ions	Peptide
0202	P02763	A1AG1_HUMAN	23497	140	2e-010	12	4.93	37	Alpha-1-acid glycoprotein 1	994.5275 1112.5270 1708.8466	993.5131 1111.5186 1707.8468	26 56 6	K.TEDTIFLR.E K.SDVVYTDWK.K K.NWGLSVYADKPETTK.E
1103	P02750	A2GL_HUMAN	38154	34	7.2	9	6.45	12	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	1179.6854	1178.6659	18	K.DLLLPQDLR.Y
1104	P02750	A2GL_HUMAN	38154	64	0.0088	14	6.45	18	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	968.5113	967.5127	26	R.YLFLNGNK.L
1203	P02765	FETUA_HUMAN	39300	104	8.1e-007	10	5.43	12	Alpha-2-HS-glycoprotein	802.3403 813.4344 1196.6118	801.3480 812.4432 1195.6197	24 21 37	K.QYGFCK.A K.FSVVYAK.C K.HTLNQIDEVK.V
2104	P00738	HPT_HUMAN	45177	224	8.1e-019	20	6.13	27	Haptoglobin	920.4524 980.4963 1203.6222 1345.6322 1707.8311	919.4552 979.4876 1202.6295 1344.6384 1706.8120	36 43 21 37 30	K.GSFPWQAK.M R.VGYVSGWGR.N K.VTSIQDWVQK.T K.SCAVAEYGVYVK.V K.YVMLPVADQDQCIR.H
3006	P00738	HPT_HUMAN	45177	136	5.1e-010	17	6.13	20	Haptoglobin	809.3663 920.4426 1345.6188 1707.8087	808.3715 919.4552 1344.6384 1706.8120	16 13 37 22	K.DYAEVGR.V K.GSFPWQAK.M K.SCAVAEYGVYVK.V K.YVMLPVADQDQCIR.H
3007	P00738	HPT_HUMAN	45177	92	1.40E-05	16	6.13	19	Haptoglobin	920.4430 1345.6157 1707.8073	919.4552 1344.6384 1706.8120	14 23 29	K.GSFPWQAK.M K.SCAVAEYGVYVK.V K.YVMLPVADQDQCIR.H
3008	P00738	HPT_HUMAN	45177	117	4.00E-08	14	6.13	14	Haptoglobin	920.4469 980.4924 1203.6094 1345.6179 1707.8086	919.4552 979.4876 1202.6295 1344.6384 1706.8120	28 16 1 6 46	K.GSFPWQAK.M R.VGYVSGWGR.N K.VTSIQDWVQK.T K.SCAVAEYGVYVK.V K.YVMLPVADQDQCIR.H
3020	P02649	APOE_HUMAN	36132	115	6.40E-08	23	5.65	44	Apolipoprotein E	899.4354 1033.5402	898.4337 1032.5352	11 22	R.FWDYLR.W R.LQAEAFQAR.L
4011	P02489	CRYAA_HUMAN	19897	133	1e-009	16	5.77	45	Alpha-crystallin A chain	1090.4823 1175.6167 1286.6127 1311.6591	1089.4839 1174.6194 1285.6303 1310.6579	5 9 16 29	R.QDDHGYISR.E R.TVLDSGISEVR.S K.VQDDFVEIHGK.H K.IQTGLDATHAER.A

Tablo 1 (devamı). MADLDI-TOF/TOF analizi sonrasında tanımlanan protein spotlarına ait veriler

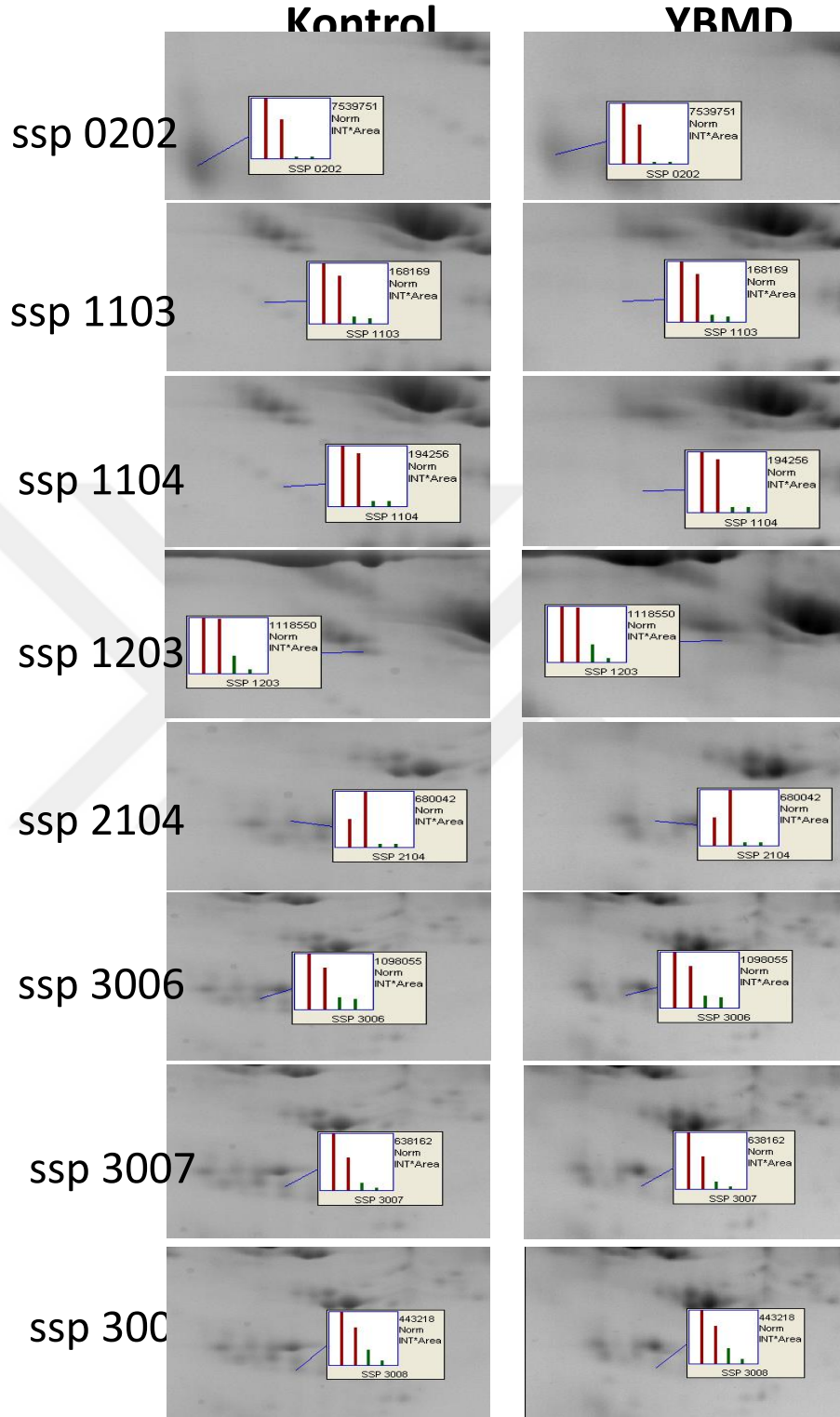
Spot No	AC no.	Best Protein Acc.	Best Protein Mass	Best Protein Score	Expect	Mat ches	Calc pI	Seq. Cov. (%)	Best Protein Description	Ion score Observed	Mr (calc)	Ions	Peptide
5005	P05813	CRBA1_HUMAN	25134	157	4e-012	21	5.81	56	Beta-crystallin A3	1455.6920 1954.8275	1454.7041 1953.8316	34 7	K.ITIYDQENFQ GK.R R.GYQYILECDHHGGDYK.H
5006	P22914	CRBS_HUMAN	20993	143	1.00E-10	17	6.44	44	Beta-crystallin S	907.4119 915.4424 1156.6113 1517.7624 2097.8061	906.4018 914.4385 1155.6037 1516.7310 2096.7663	18 19 11 24 4	R.WMGLNDR.L K.ITFYEDK.N R.AVHLPSSGGQYK.I K.ITFYEDKNFQGR.R R.YDCDCDCADFHTYLSR.C
6003	P05813	CRBA1_HUMAN	25134	155	6.4e-012	20	5.81	54	Beta-crystallin A3	1455.6728 1847.8367 1954.8054	1454.7041 1846.8461 1953.8316	34 4 25	K.ITIYDQENFQ GK.R K.IQSGAWVCYQYPGYR.G R.GYQYILECDHHGGDYK.H
7003	P43320	CRBB2_HUMAN	23365	300	2e-026	27	6.5	66	Beta-crystallin B2	983.4629 1000.4325 1024.4380 1408.7178 1726.8201 1760.8373	982.4760 999.4345 1023.4410 1407.7398 1725.8071 1759.8318	53 13 24 36 23 16	K.GEQFVFEK.G R.DMQWHQR.G R.WDSWTSSR.R K.IILYENPNFTGK.K K.DSSDFGAPHPQVQSVR.R R.VQSGTWWVGYQYPGYR.G
7004	P22914	CRBS_HUMAN	20993	96	5.7e-006	17	6.44	41	Beta-crystallin S	891.4082 1517.7372 1729.9080 2097.7849	890.4069 1516.7310 1728.8947 2096.7663	4 18 4 1	R.WMGLNDR.L K.ITFYEDKNFQGR.R R.KPIDWGAASPAVQSFRR R.YDCDCDCADFHTYLSR.C
8003	P02511	CRYAB_HUMAN	20146	134	8.1e-010	12	6.76	35	Alpha-crystallin B chain	1088.5059 1496.6857 1512.6663	1087.5047 1495.6766 1511.6715	21 67 (26)	R.QDEHGFISR.E R.APSWFDTGLSEMR.L R.APSWFDTGLSEMR.L
9003	P01834	IGKC_HUMAN	11602	8.1e-007	8.1e-007	13	5.58	55	Ig kappa chain C region	1875.9359 1946.0145 1797.8800 1875.9082 1945.9818	1874.9197 1945.0197 1796.8880 1874.9197 1945.0197	8 8 15 9 13	K.VYACEVTHQGLSSPVTK.S -.TVAAPSVFIFPPSDEQLK.S K.SGTASVVCLLNNFYPR.E K.VYACEVTHQGLSSPVTK.S -.TVAAPSVFIFPPSDEQLK.S

Tanımlanan 17 proteinin gruplar arasında nasıl bir regülasyona uğradığını daha net belirleyebilmek için, spotların yoğunlukları ölçülüp oranlamalar yapılmıştır (Tablo 2). Alpha-1-acid glycoprotein 1, Leucine-rich alpha-2-glycoprotein, Alpha-2-HS-glycoprotein, Haptoglobin, Alpha-crystallin A chain, Beta-crystallin A3, Beta-crystallin S, Alpha-crystallin B chain ve Ig kappa chain C region proteinlerinin YBMD grubunda 2-kat regülasyon kriterine göre down-regüle, sadece Apolipoprotein E'nin up-regüle olduğu görüldü. Jeller üzerinde kesilen bazı spotlar tanımlandığında bu spotların aynı proteinlere ait olduğu görülmüştür. Leucine-rich alpha-2-glycoproteini iki farklı spotun, Haptoglobini dört farklı spotun, Beta-crystallin A3'ü iki farklı spotun ve Beta-crystallin S'i iki farklı spotun temsil ettiği görülmüştür. Bu bir deneysel sorun olmayıp, ya bu proteinlerin örnek içerisindeki miktarının fazla olmasından ya da proteinler üzerindeki post-translasyonel değişimlerin proteinin odaklama noktasını değiştirmesinden kaynaklanmaktadır. Hatta aynı proteine ait iki farklı spottan biri up-regüle iken diğeri down-regüle olabilmektedir. Bu proteinlerden hangisinin posttranslasyonel değişime uğradığı ileri analizler sonucunda belirlenebilecektir.

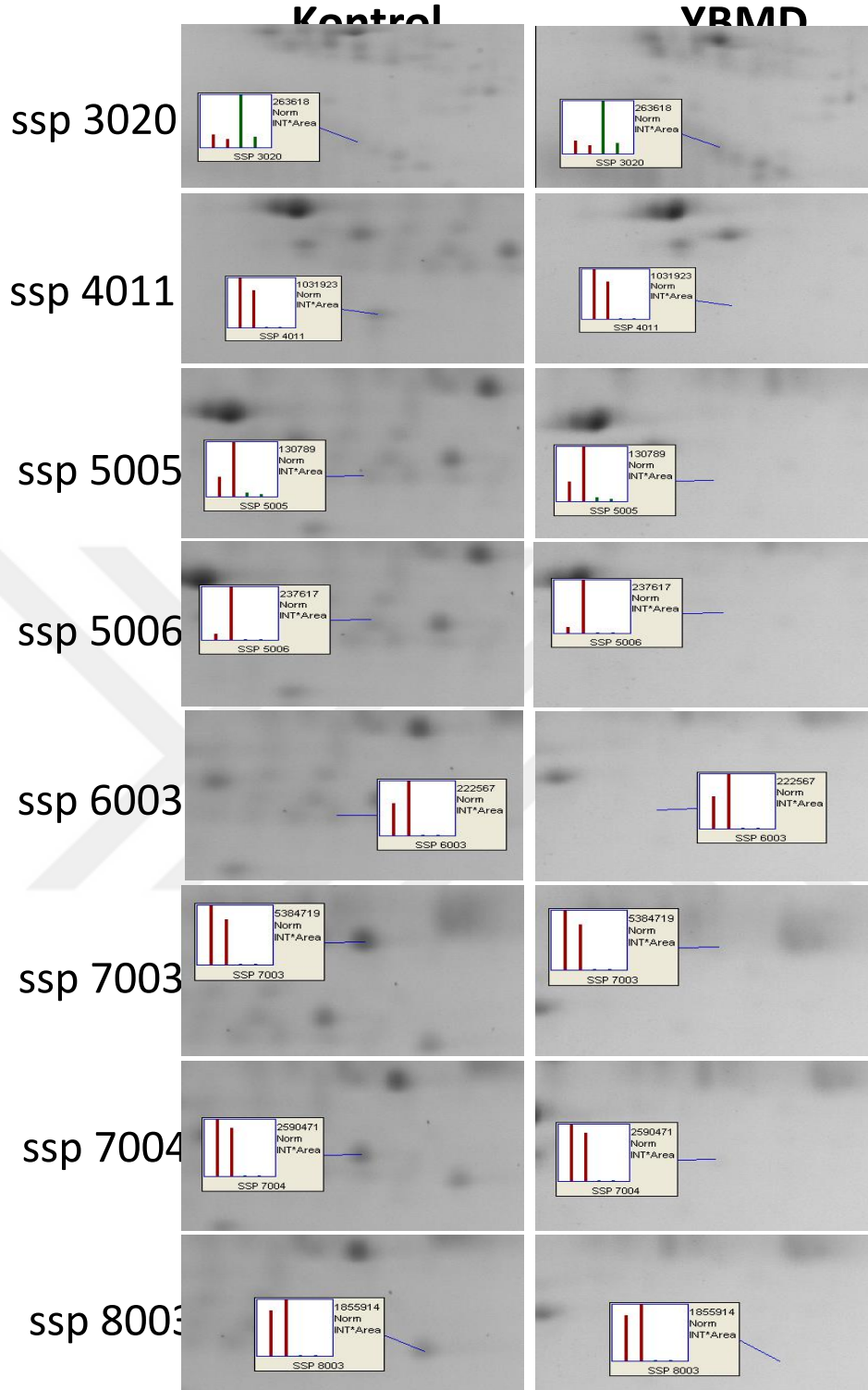
Elde edilen regülasyon oranlarının görsel olarak da gerçekliğini gösterebilmek için ilgili spotlar, jeller üzerinde bulunarak yakın-çekim resimleri alındı (Şekil 8 ve 9). Yapılan görsel analiz sonucunda spotların yoğunluk ölçümlerinin doğru tayin edildiği ve elde edilen regülasyon oranlarının doğru ifade edildiği kanaatine varıldı

Tablo 2. Miktarlarında regülasyon görülen ve MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinlerin gruplara göre hesaplanmış regülasyon oranları. Tabloda verilen yoğunluk değerleri K ve YBMD sütunları altında listelenmiştir. Yeşil renkli ok down-regülasyonu, kırmızı renkli ok ise up-regülasyonu temsil etmektedir. (K, Kontrol; YBMD, Yaşa bağlı makula dejenerasyonu).

SSP No	Best Protein Description	Kontrol	YBMD	YBMD'nin K'ye göre regülasyon oranı	Regülasyon trendi
SSP 0202	Alpha-1-acid glycoprotein 1	6248554	174606	35.79	↓
SSP 1103	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	151620	17044.7	8.9	↓
SSP 1104	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	183262	15174.4	12.08	↓
SSP 1203	Alpha-2-HS-glycoprotein	1113174	216962	5.13	↓
SSP 2104	Haptoglobin	510343	34364.7	14.85	↓
SSP 3006	Haptoglobin	967005	218104	4.43	↓
SSP 3007	Haptoglobin	504836	54310.7	9.3	↓
SSP 3008	Haptoglobin	379646	83698.9	4.54	↓
SSP 3020	Apolipoprotein E	52575	158511	3.01	↑
SSP 4011	Alpha-crystallin A chain	908890	1165.9	779.54	↓
SSP 5005	Beta-crystallin A3	88744	6665.9	13.31	↓
SSP 5006	Beta-crystallin S	131982	0	0	↓
SSP 6003	Beta-crystallin A3	177224	0	0	↓
SSP 7003	Beta-crystallin B2	4779768	20585.7	232.19	↓
SSP 7004	Beta-crystallin S	2409351	11149.4	216.1	↓
SSP 8003	Alpha-crystallin B chain	1685458	7863	214.35	↓
SSP 9003	Ig kappa chain C region	2244511	61956.7	36.23	↓

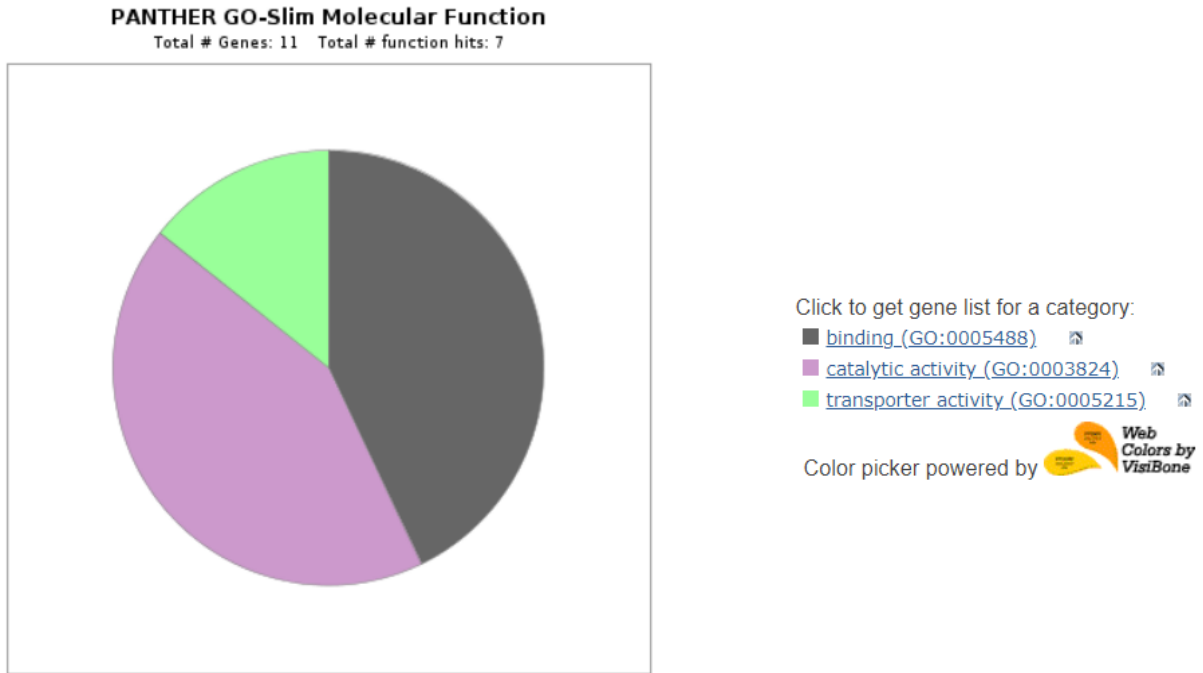


Şekil 10. SSP 0202, SSP 1103, SSP 1104, SSP 1203, SSP 1511, SSP 2104, SSP 3006, SSP 3007 ve SSP 3008 numaralı protein spotlarının yakın-çekim resimleri



Şekil 11. SSP 3020, SSP 4011, SSP 5005, SSP 5006, SSP 6003, SSP 7003, SSP 7004 ve SSP 8003 numaralı protein spotlarının yakın-çekim resimleri

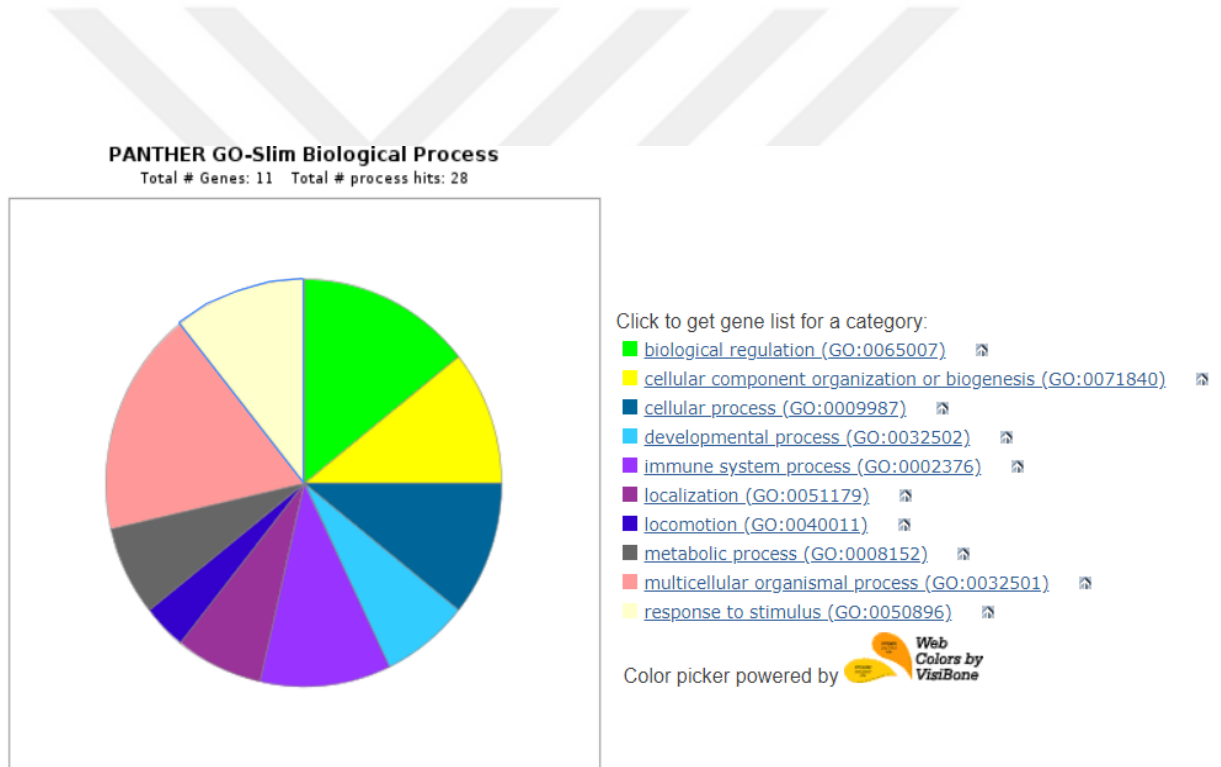
Yapılan karşılaştırmalı proteom analizinde 17 protein spotunda regülasyon varlığı tespit edildi. YBMD hastalarında kontrol grubuna göre 16 protein spotunun düzeyinde azalma olduğu görüldü. Bu proteinlerin fonksiyonel analizlerini yapabilmek için proteinler ile ilgili bilgiler PANTHER veri bankasından araştırıldı. Tanımlanan proteinlerin çoğunluğunu katalitik ve bağlanma aktivitesi gösteren proteinler olduğu, bir kısmının da transport aktivitesi gösteren proteinler (ApoE) olduğu görüldü (Şekil 12 ve Tablo 3). Aynı proteinler görev aldıkları biyolojik proseslere göre kategorize edildiğinde bu proteinlerin çeşitli biyolojik proseslerde rol oynadığı dikkati çekmektedir. Bu prosesler ağırlıklı olarak biyolojik regülasyon, hücresel komponentlerin organizasyonu ve biyogenez, hücresel prosesler ve multicellular organismal prosesler olmak üzere, çeşitli metabolik proseslerde, lokalizasyon ve stimulusa cevap oluşturan proseslerin de olduğu görülmektedir (Şekil 13 ve Tablo 4). Bu hücresel proseslerde rol oynayan proteinler Alpha-2-HS-glycoprotein, Immunoglobulin kappa constant, Leucine-rich alpha-2glycoprotein, Alpha-crystallin A chain ve Alpha-crystallin B chain olarak tanımlanmıştır. Bu tip proteinler, birçok metabolik olayda merkezi destek görevi gördüğü için “hub proteinler” olarak adlandırılır.



Şekil 12. Proteinlerin moleküler fonksiyon özellikleri baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

Tablo 3. Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu moleküler fonksiyonlarına göre dağılım tablosu

Moleküler Fonksiyon	İlişkili Proteinler
Binding	Apolipoprotein E Immunoglobulin kappa constant Leucine-rich alpha-2-glycoprotein
Katalitik aktivite	Apolipoprotein E Haptoglobin Alpha-2-HS-lycoprotein
Transporter activity	Apolipoprotein E

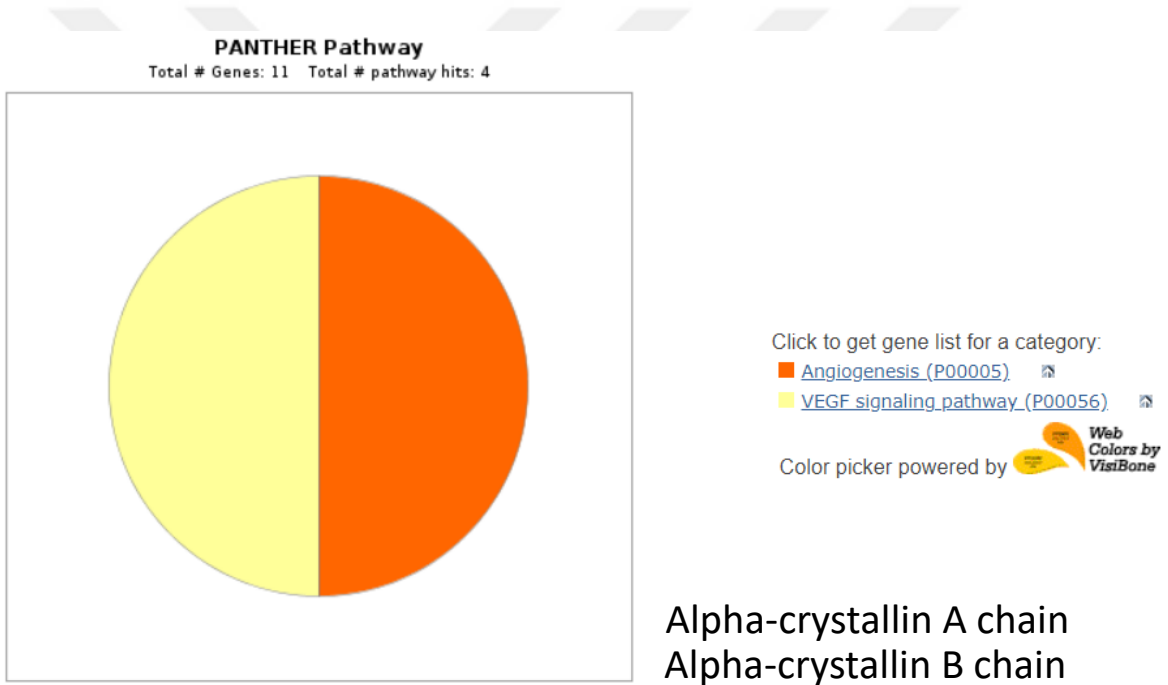


Şekil 13. Proteinlerin katıldığı biyolojik prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

Tablo 4. Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu biyolojik proseslerine göre dağılım tablosu.

Biyolojik Proses	İlişkili Proteinler
Biyolojik Regülasyon	Alpha-2-HS-glycoprotein Apolioprotein E Immunoglobulin kappa constant Leucine-rich alpha-2glycoprotein
HücreSEL bileşen organizasyonu ve biyogenezi	Apolioprotein E Immunoglobulin kappa constant Leucine-rich alpha-2glycoprotein
HücreSEL süreç	Apolioprotein E Immunoglobulin kappa constant Leucine-rich alpha-2glycoprotein
Gelişimsel süreç	Apolioprotein E Leucine-rich alpha-2glycoprotein
İmmün sistem süreci	Immunoglobulin kappa constant Alpha-crystallin A chain ve Alpha-crystallin B chain
Lokalizasyon	Apolioprotein E Immunoglobulin kappa constant
Hareket	Leucine-rich alpha-2glycoprotein
Metabolik süreç	Apolioprotein E Immunoglobulin kappa constant
Çok hücreli organizma süreci	Apolioprotein E Immunoglobulin kappa constant Alpha-crystallin A chain Alpha-crystallin B chain Leucine-rich alpha-2glycoprotein
Uyarana cevap	Apolioprotein E Immunoglobulin kappa constant Leucine-rich alpha-2glycoprotein

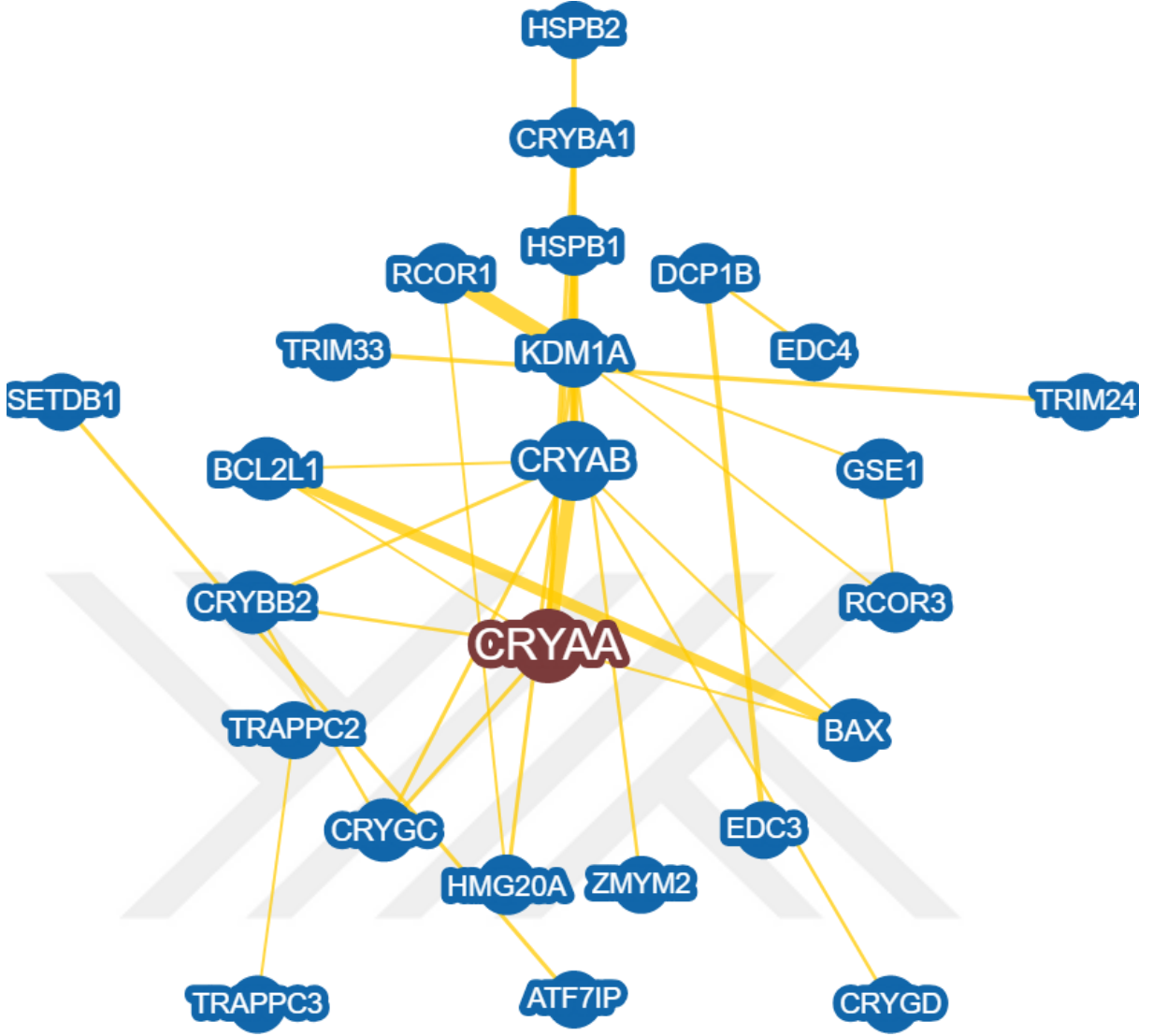
Proteinlerin hangi metabolik yollarda görev aldıklarını görebilmek için yaptığımız analizde ise Alpha-crystallin A chain ve Alpha-crystallin B chain dikkati çekmektedir. Her iki proteinin de anjiogenez ve VEGF sinyal iletim yollarında fonksiyon yaptığı görülmektedir (Şekil 14, Tablo 5). Yapılan BioGrid analizinde her iki proteinin de hücrede merkezi bir yer tuttuğu birden fazla metabolik yolağı etkilediği ve özellikle sinyal iletim mekanizmaları ile ilişkili olduğu görülmüştür. Alpha-crystallin A chain için 68 etkileşim, 117 etkileştiği protein bulunmuştur. Alpha-crystallin B chain için 112 etkileşim, 244 protein bulunmuştur. BioGrid tarafından oluşturulan metabolik network analizinde her iki protein için de karmaşık bir interaktom paterni üretilmiş olup, bu paternlerden hangisinin YBMD ile ilişkili olduğu bilinmemektedir (Şekil 15 ve 16). Ancak yapılacak ileri analizlerle (Nano-HPLC, LC-MS/MS) bu durum açıklığa kavuşturulabilir.



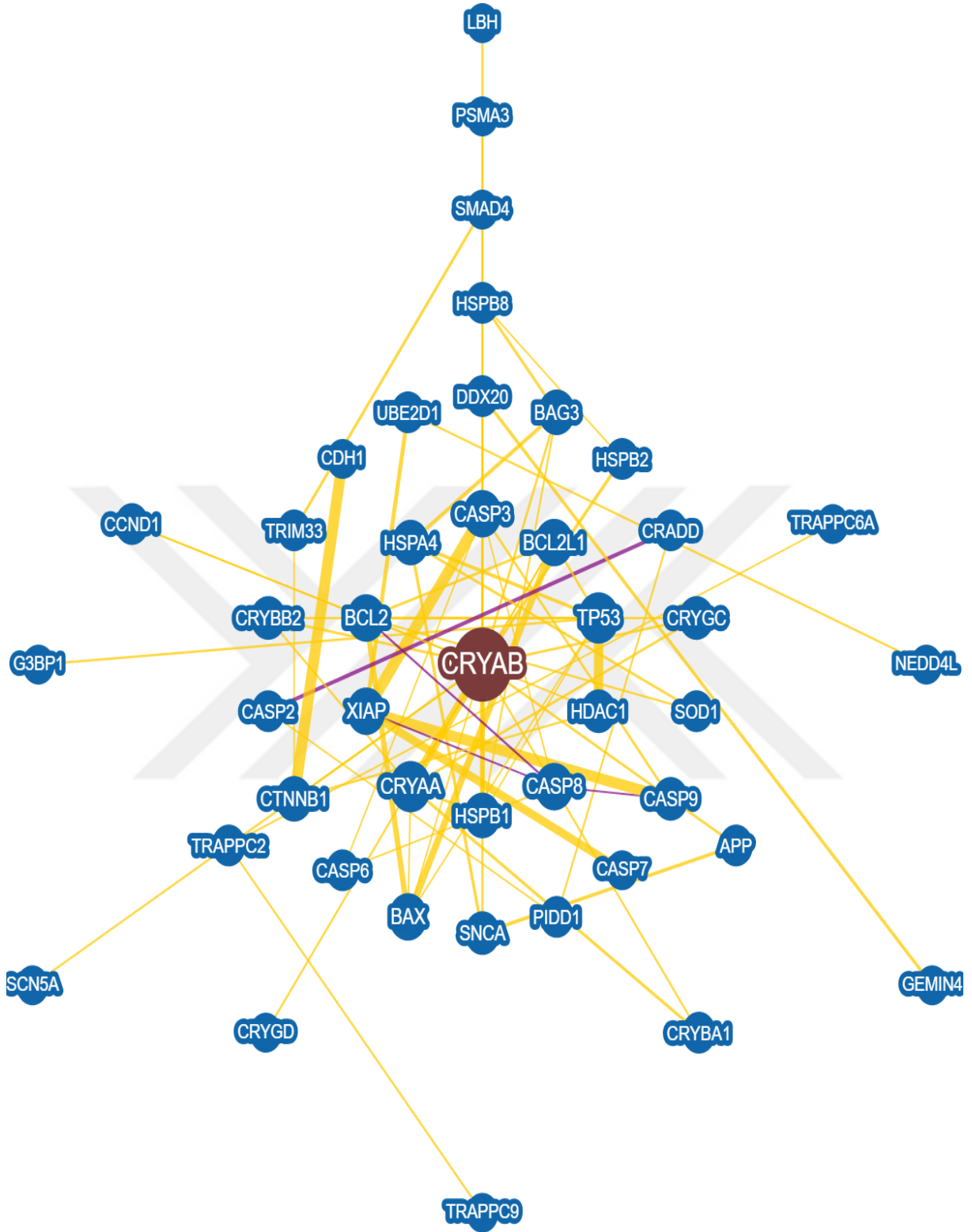
Şekil 14. Biyolojik prosesler baz alınarak yapılan PANTHER analiz sonucu

Tablo 5. Tanımlanan proteinlerin PANTHER analizi sonucu pathway'e göre dağılım tablosu

Biyolojik Proses	İlişkili Proteinler
Angiogenesis	Alpha-crystallin A chain Alpha-crystallin B chain
VEGF Signalling Pathway	Alpha-crystallin A chain Alpha-crystallin B chain

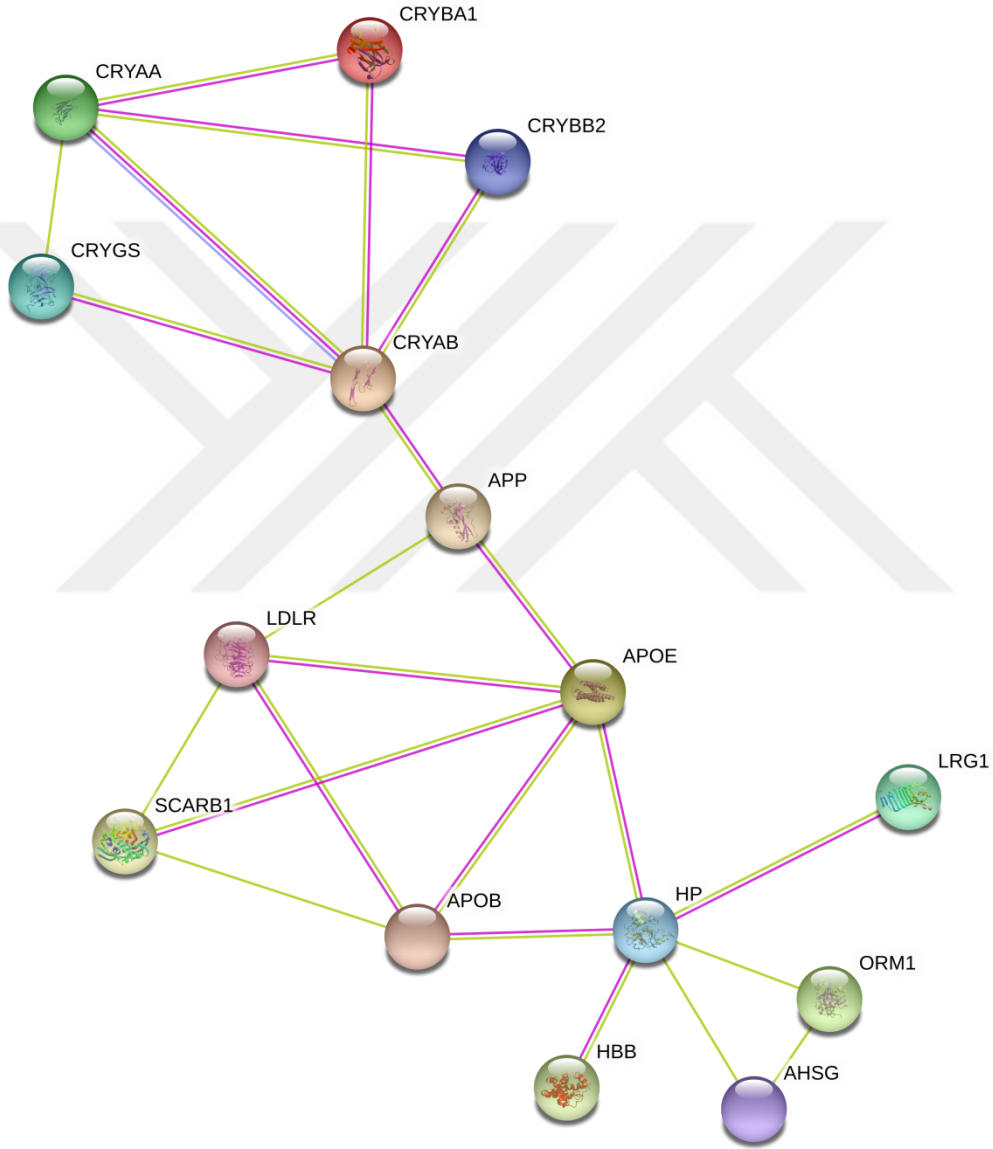


Şekil 15. BioGrid analizi sonucu Alpha-crystallin A chain protein için oluşturulan interaktom verisi (Minimum delil seviyesi 3 olarak alınmıştır).

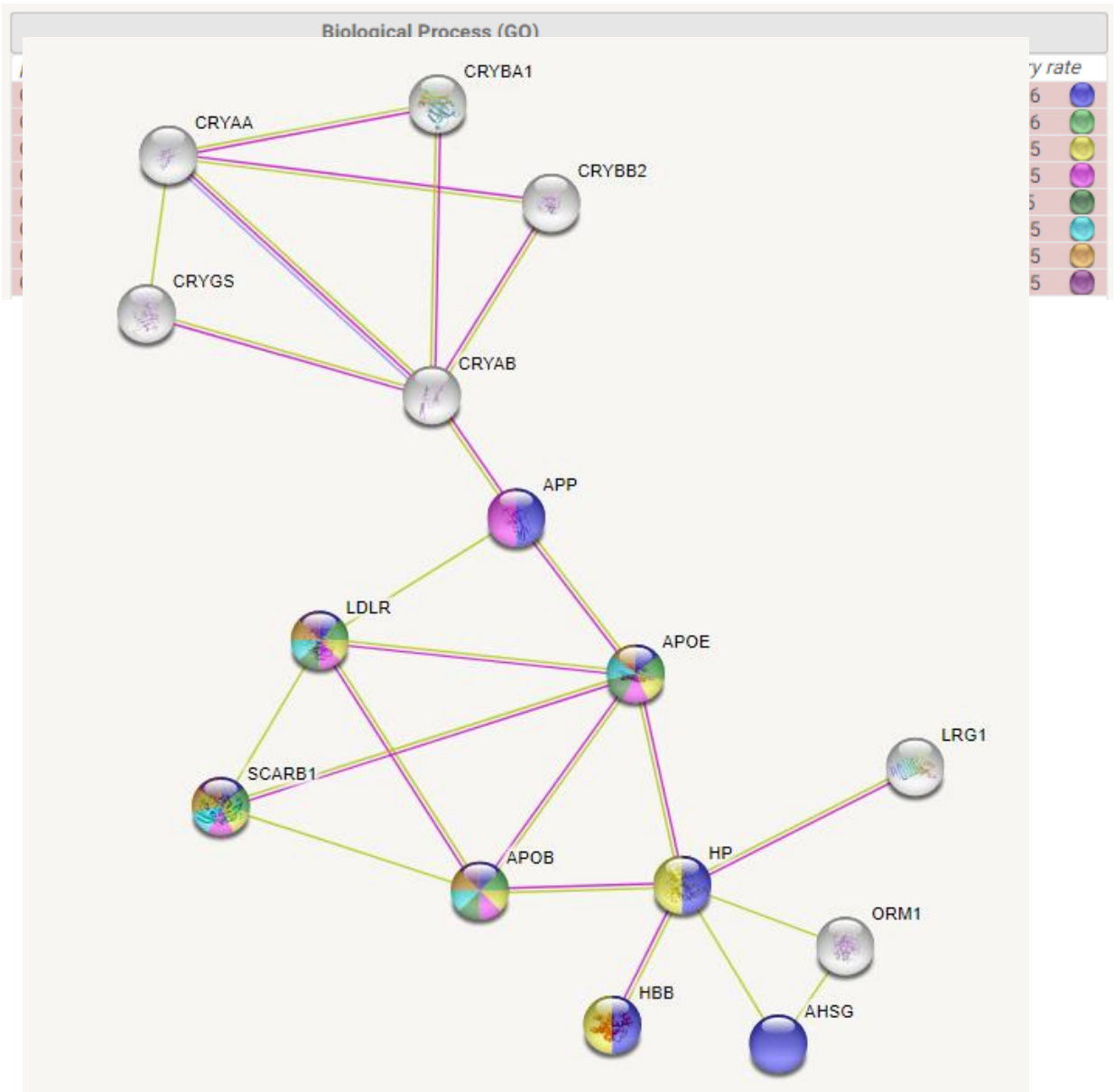


Şekil 16. BioGrid analizi sonucu Alpha-crystallin B chain protein için oluşturulan interaktom verisi (Minimum delil seviyesi 3 olarak alınmıştır)

PANTHER ve BioGrid analizleri tanımlanan proteinlerin interaktomlarını belirlemede net sonuçlar vermediği için elde ettiğimiz verileri STRING analizine de tabi tuttuk. STRING analizinde proteinler arası etkileşim kriterleri sıkı tutulduğunda, tanımlanan tüm proteinlerin birbiri ile etkileştikleri, ancak belirgin bir metabolik yol üzerinden anlam ifade etmediği görüldü. Etkileşim kriterleri sıkı tutulmadığında ise tanımlanan proteinlerin anlamlı yollarla ilişkilendirildiği görülmüştür (Şekil 17, 18, 19 ve 20).

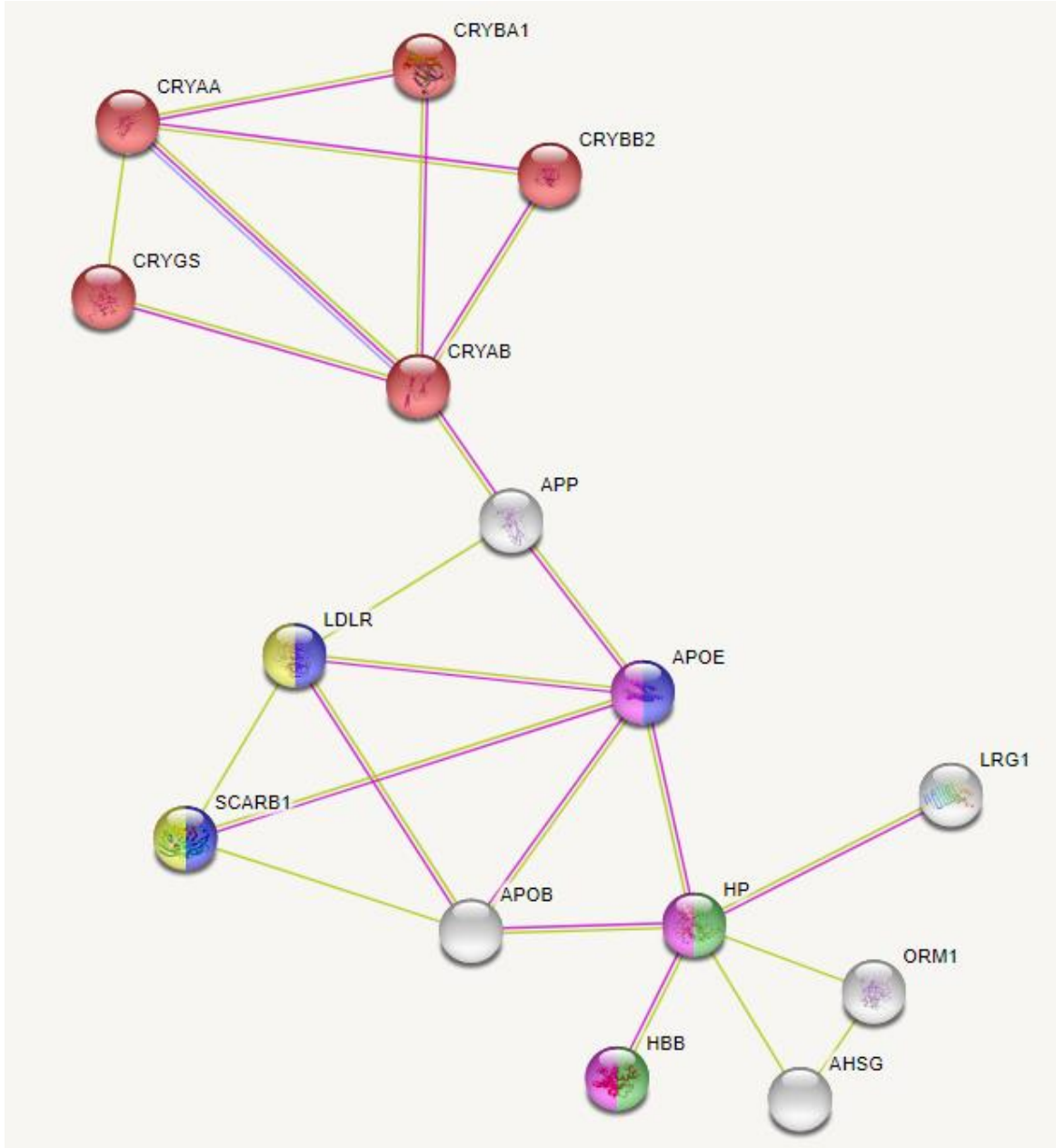


Şekil 17. STRING Analiz sonucu.



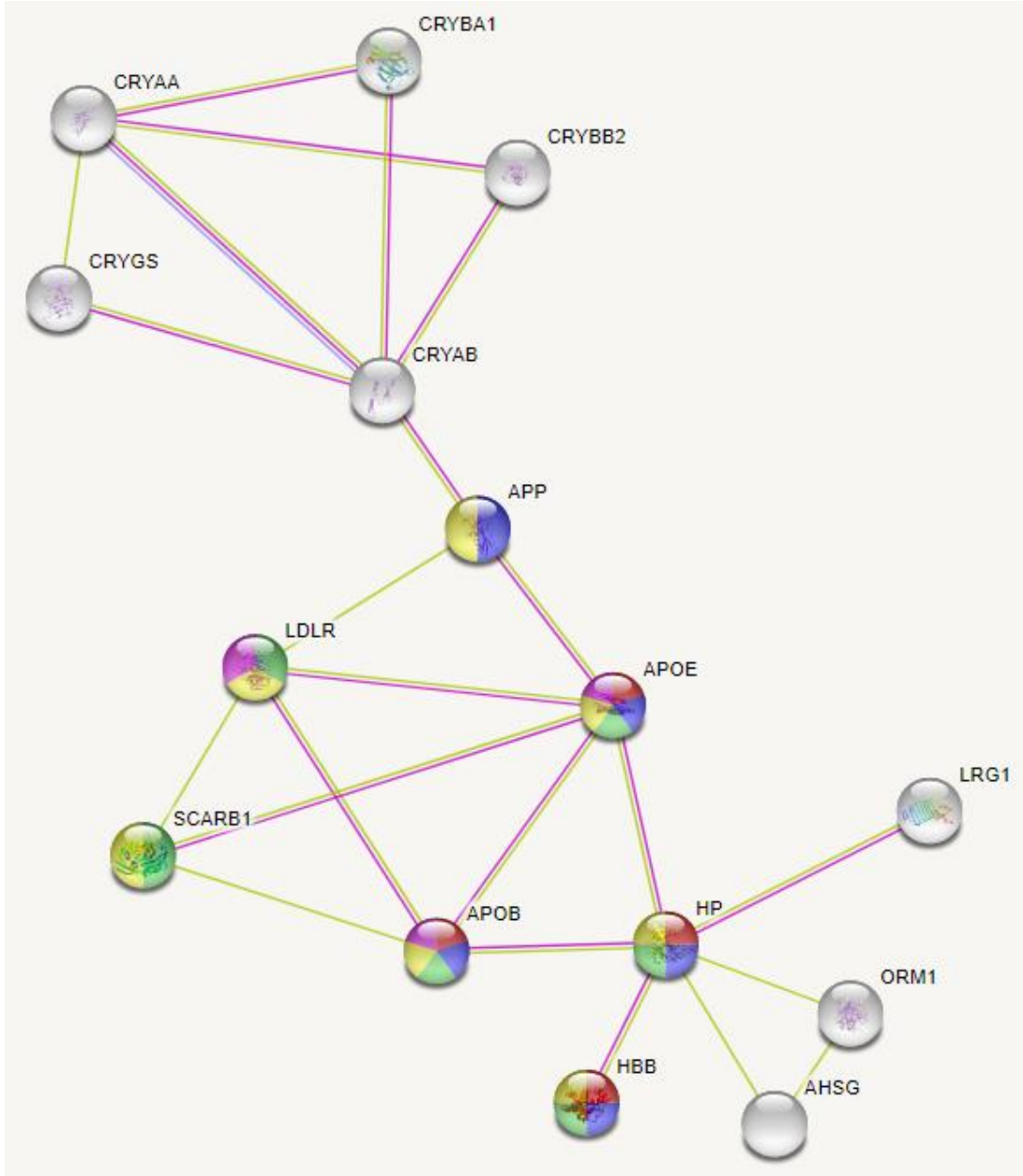
Şekil 18. STRING analizi sonucunda elde edilen verilerin biyolojik prosesler ile ilişkisi

Molecular Function (GO)			
pathway ID	pathway description	count in gene set	false discovery rate
GO:0005212	structural constituent of eye lens	5	6.38e-09
GO:0071813	lipoprotein particle binding	3	0.000877
GO:0030492	hemoglobin binding	2	0.00309
GO:0016209	antioxidant activity	3	0.0112
GO:0030169	low-density lipoprotein particle binding	2	0.024



Şekil 19. STRING analizi sonucunda elde edilen verilerin moleküler fonksiyon ile ilişkisi

Cellular Component (GO)			
pathway ID	pathway description	count in gene set	false discovery rate
GO:0071682	endocytic vesicle lumen	4	7.24e-07
GO:0060205	cytoplasmic membrane-bounded vesicle lumen	5	1.64e-06
GO:0030139	endocytic vesicle	6	2.19e-06
GO:0044433	cytoplasmic vesicle part	7	9.13e-06
GO:0034362	low-density lipoprotein particle	3	2.48e-05



Şekil 20. STRING analizi sonucunda elde edilen verilerin hüresel komponentler ile ilişkisi

5.TARTIŞMA

Yaşla bağılı maküla dejenerasyonu (YBMD) dünyada gelişmiş ülkelerde körlüğün önde gelen nedenlerindedir, hastalık insidansını tahmin etmek, riskli bireyleri tanımlamak, nedensel patofizyolojik etyolojileri aydınlatmak, izleme ve tedavi parametreleri ve hastalık sonuçlarını öngörmek, kılavuz taraması yapmak için farklı biyobelirteçlerin tanımlanmasına çok fazla araştırma ve çaba harcanmıştır. Bugüne kadar, bir dizi genetik, çevresel, proteomik ve hücrenel hedef, YBMD için hem risk faktörleri hem de potansiyel biyobelirteçler olarak tanımlanmıştır. Bu faktörlerin daha iyi anlaşılması ve YBMD için potansiyel biyobelirteç olarak kullanılması, gelecekteki araştırmalara ve klinik uygulamalara rehberlik edebilir(114). Proteome analizi geniş protein ailesinden eş zamanlı değerlendirmeyi sağlar.

İnsan vitreusundan alınan örnekler sitokinlerin vitreus boşluğuna akması ve retinaya yakınlığı nedeniyle YBMD için en iyi biyobelirteç kaynağı olarak nitelendirilebilir (115.) Bununla birlikte, en çok yayınlanan eksüdatif YBMD ile ilgili protein analizleri deney hayvan modelleri, ex vivo örnekler veya in vivo olarak hastaların cerrahiye başlamadan anterior chamber maintainer (ACM) girişinden ön kamaradan örnek alımı şeklinde olmuştur (116-117-118-119).Biz ek bir retina ve sistemik patolojisi olmayan insanlardan vitreus örneği alarak bu konuda daha iyi sonuçlar verdiği gösterilmiş bir yöntem kullandık. Preop vitreus örneği sağlıklı kontrol grubundan ve YBMD grubundan işleme başlamadan önce herhangi bir kontaminasyon riski minimum olacak şekilde alınmaya çalışıldı.

Biz bu çalışmada, Alpha-1-acid glycoprotein 1, Leucine-rich alpha-2-glycoprotein, Alpha-2-HS-glycoprotein, Haptoglobin, Alpha-crystallin A chain, Beta-crystallin A3, Beta-crystallin S, Alpha-crystallin B chain ve Ig kappa chain C region proteinlerinin YBMD grubunda 2-kat regülasyon kriterine göre down-regüle, sadece Apolipoprotein E'nin up-regüle olduğunu gördük.” Aşağıda bu proteinler ile ilgili literatür bilgisini ve bu proteinlerin hastalıkla olan ilişkilerini tartıştık

Alpha-1-acid glycoprotein 1: Alfa 1-asit glikoprotein (AAG), insan plazmasının ana akut faz proteini'dir. Kan akışında transport proteini olarak fonksiyon görüp Beta-varil alanının iç kısmında çeşitli ligandları bağlar. Ayrıca sentetik ilaçları bağlar ve vücutta dağılımı ve kullanılabilirliğini etkiler. Akut faz reaksiyonu sırasında bağışıklık sisteminin aktivitesini modüle etmek için işlev görür(120).Karaciğer tarafından üretilir ve plazmada salgılanır. Sentezi glukokortikoidler, interlökin-1 ve interlökin-6 ile kontrol edilir, iltihaplanma üzerine 5-50 kat artar

Rema M. Ve ark. yaptıkları çalışmada Diyabetik Retinopati ve kontrol grubu arasında serum albumin, alfa-1 asit glikoprotein, alfa-1 antitripsin ve seruloplazmin düzeylerinde anlamlı olarak farklılık bulunmadığını göstermişlerdir. Bu çalışmada hastaların alınan kan serum örneğinin -20 derecede saklanıp ardından eritilerek analiz edilmiştir (121). Zhou L. Ve ark. aldıkları gözyaşı örneklerini, iTRAQ teknolojisi ile 2D-nanoLC-nano-ESI-MS / MS yöntemini kullanarak proteinleri açığa çıkarmak için istatistiksel bir model kullandılar. Çalışma sonucunda Kuru göz durumunun inflamasyon şiddetinin klinik sınıflandırması ile alfa1-asit glikoprotein 1 düzeylerinin arasında anlamlı korelasyon olduğunu bu hastalıkta arttığını başarılı bir şekilde ilişkilendirilmiştir(122).Gupta AK ve ark. yaptığı çalışmada serum alfa-1 asit glikoproteininin orta ve ciddi üveit tiplerinde seviyelerin anlamlı olarak arttığı; hafif tipte normal olduğu görüldü. Serum alfa-1 asit glikoprotein seviyeleri hastalığın şiddetine yakın bir şekilde paralel olduğu ve bu proteinin serum seviyeleri klinik iyileşmeden sonra normale döndüğü ortaya konuldu(123).

Yaptığımız çalışmamızda alfa-1 asit glikoprotein YBMD grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre 35.79 kat down regüle yani protein ekspresyonu bu oranda azaldığı sonucuna vardık. Pozitif akut faz reaktanı olarak kabul edilen ve inflamasyon sonucunda artması beklenen alfa-1 asit glikoproteininin bizim çalışmamızda beklenenin tersine düşük çıkması bu proteinin belirlenen fizyolojik etkilerine ek olarak başka fizyolojik rollerinin de olabileceğini göstermektedir. Özellikle regülasyon düzeyindeki artışın göz ardı edilemeyecek kadar yüksek olması yaptığımız analizin doğru bir analiz olduğunu ve bu proteinin seviyesindeki YBMD'de azalışının irdelenmesi gerektiğinin vurgulamaktadır. Bu konuda cevap veremediğimiz sorulardan bir tanesi gözlemediğimiz değişimin her bir hastada benzer şekilde görülüp görülmediği ve bu artışa her bir hastanın eşit katkı yapıp yapmadığıdır. Bu soruya cevap verebilmek için alfa-1 asit glikoprotein antikoru ile western blotlama yaparak her bir hastadaki ekspresyon seviyelerini tespit etmek gerekmektedir.

Leucine-rich alpha-2-glycoprotein: Dönüştürücü büyüme faktörü beta reseptörü (TGF-Beta) ile seçici ve kovalent olmayan bir şekilde etkileşime girer. Endotel hücre çoğalmasının hızını veya derecesini aktive eden veya arttıran herhangi bir süreçte etkilidir(124).

Xiaomeng Wang ve arkadaşları TGF β 1 varlığında Leucine-rich alpha-2-glycoprotein(LRG-1) 'in endotelial hücelere mitojenik etki yaptığı ve anjiyogenezini desteklediği gösterilmiştir. LRG1, TGF β 1 varlığında, pro-anjiyogenik teşvik ile sonuçlanan TGF β aksesuar reseptör endogline doğrudan bağlanır. TGF β sinyallemesini modüle ederek etkisine aracılık eden yeni bir anjiyogenez düzenleyicisini ortaya koymaktadır. Koroid ve retinal neovaskülarizasyon modellerinin retinalarında LRG-1 transkriptinin de artmış olup olmadığını araştırdıkları çalışmada farelerde lazer hasarı ile koroidal neovaskülarizasyonu (CNV) indükleyip bir hafta sonra hem retina hem de RPE / koroidde LRG-1 transkript seviyelerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Bu veriler, retina LRG1 ekspresyonunun baskın olarak vasküler , konstitütif olduğunu ve neovasküler büyüme sırasında arttığını göstermektedir. Bu çalışmalardan, LRG1'in oküler hastalıkta ve potansiyel olarak kanser ve ateroskleroz gibi diğer hastalıklarda patojenik anjiyogenezini kontrol etmek için oldukça umut verici bir terapötik hedef olduğunu akla getirmiştir(125).

Wang X. ve ark. yaptıkları çalışmada LRG1'in göz dahil olmak üzere çeşitli insan dokularında lokalize olduğu gösterilmiş olup, murin modelinde oksijenin indüklediği iskemik retinopatide arttığı bulunmuştur. Gerçekten de, Proliferatif Diyabetik Retinopati (PDR) gözlerinde intravitreal LRG1 düzeyleri arttığı gözlemlenmiştir(125).

Bizim çalışmamızda ise Leucine-rich alpha-2-glycoprotein(LRG-1) 2 farklı spot olarak görülmüştür. SSP 1103 numaralı spotta LRG-1, YBMD grubunda kontrol grubuna göre 8.9 kat protein ekspresyonu azalmış, SSP 1104 numaralı spotta ise 12.08 kat azaldığı görülmüştür. Anjiogenezis düzenleyicisi ve endotelial hücelere mitojenik etki yaptığı gösterilmiş olan LRG-1 in YBMD grubunda artması beklenirken düşük olmasını bu proteinin belirlenen fizyolojik etkilerine ek olarak başka fizyolojik rollerinin de olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuca cevap verebilmek için LRG 1 in antikoru ile western blotlama yaparak her bir hastadaki ekspresyon seviyelerini tespit etmek gerekmektedir.

Alpha-2-HS-glycoprotein: Endositozu teşvik eder, opsonik özelliklere sahiptir ve kemiğin mineral fazını etkiler. Fetuin A olarak da bilinir. Kalsiyum ve baryum iyonları için afinite gösterir. Enflamatuar cevabın frekansını, hızını veya kapsamını, kimyasal veya fiziksel ajanların neden olduğu enfeksiyon veya yaralanmaya karşı (omurgalı doku ile) ani savunma reaksiyonunu modüle eden herhangi bir işlem sürecinde görevlidir(124). Bir fosfat grubunun, genellikle ATP'den bir substrat molekülüne transferini katalize eden bir enzim olan kinazların aktivitesini durdurur, önler veya azaltır.(Diabetes Metab. Res. Rev. 18:305-310(2002) . Fetuin-A, karaciğerde özel olarak üretilen bir glikoproteindir ve sonra yüksek konsantrasyonlarda dolaşım içine salgılanır(126).

Kemirgenlerde, tirozin kinaz reseptörü üzerinden insülin etkisini inhibe ettiği gösterilmiştir(127). Chunming Zhao ve arkadaşlarının Diyabetik Retinopati(DR) tanısı olan 224 hasta ve 68 sağlıklı kontrol grubundan aldıkları serum ve vitreus örneklerinden yaptıkları inceleme sonucunda serum ve vitreus fetuin-A konsantrasyonlarının yüksekliği ile DR'nin ortaya çıkışı ve hastalığın ilerlemesi ile korele olduğu sonucuna varılmıştır. Vitreus örnekleri vitrektomi yapılacak hastalardan cerrahiye başlamadan önce açılan sklerotomiden elde edilmiştir(128).

Bizim çalışmamızda Alpha-2-HS-glycoprotein YBMD grubunda kontrol grubuna göre 5.13 kat daha düşük çıkmıştır.. Epidemiyoloji ve laboratuvar çalışmaları, enflamasyonun YBMD patogenezinde rol aldığını göstermektedir(51-54). Alpha-2-HS-glycoprotein inflamasyon gibi durumlarda negatif akut faz reaktanı olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur(129). Negatif akut faz reaktanı olduğu gösterilmiş olan Alpha-2-HS-glycoprotein'in inflamasyona sekonder cevap olarak azalması beklenmektedir Bu durum, sonuçlarımızla uyumlu olup, YBMD nin etyopatolojisinde rol alan inflamasyon mekanizmasını desteklemektedir.

Haptoglobin: Hemoliz sonucu, hemoglobinin böbrek içinde biriktiği ve idrarda salgılandığı bulunmuştur. Haptoglobin heme demirin hepatik geri dönüşümünü sağlamak ve böbrek hasarını önlemek için serbest plazma hemoglobin ile birleşir ve birleştirir. Haptoglobin aynı zamanda bir Antimikrobiyal; Antioksidan, antibakteriyel aktiviteye sahiptir ve akut faz tepkisinin birçok yönünü modüle etmede rol oynar. Hemoglobin / haptoglobin kompleksleri, bir endositik lizozomal parçalanma yolu yoluyla karaciğer Kupfer hücrelerinin yüzeyi üzerinde eksprese edilen makrofaj CD163 tutucu reseptörüyle hızlı bir şekilde temizlenir. İki alfa ve iki beta zincirinden oluşan Tetramer disülfid bağları içerir. Hemoglobin / haptoglobin kompleksi, iki

hemoglobin alfa-beta dimerine bağı bir haptoglobin dimerinden oluşur. CD163 ile etkileşime girer. Ayrıca, zonulin olarak da bilinen kısaltılmamış haptoglobin, intestinal geçirgenlikte bir rol oynar, hücreler arası sıkı bağlantı sökülmesine izin verir ve kendi kendine antijenlere karşı tolerans ve bağışıklık arasındaki dengeyi kontrol eder (130)

Haptoglobin, serum viskozitesini artırır ve bu, diyabetik retinopatinin patogenezinde rol oynadığı mekanizma olabilir(131).Ancak Kazuhiro Kimura ve arkadaşları yaptıkları çalışmada epiretinal membran (ERM) ve Diabetik retinopati hastalardan vitrektomi öncesi aldıkları vitreus örneklerinde yaptıkları incelemede iki grup arasında haptoglobin düzeyi arasında anlamlı farklılık bulunmadığını göstermişlerdir (132). Chandra T ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise Haptoglobin(HP 2-) frekanslarında sağlıklı gruba göre retinopati gelişmemiş Diyabetes Mellitus(DM) hastalarında ve Diyabetik Retinopati(DR) olanlara göre anlamlı bir düşüş bulunmuş olup, bu da hem DM hem de DR'de haptoglobin heterozigotlarının karşı koruma sağladığı (yaklaşık 0.31'lik bir relatif riski ile) şeklinde yorumlanmış olup, akut faz reaktanı olarak HP nin, immünolojik ve inflamatuvar süreçlerle ilişkili olan DM ve DR'nin etiolojisinde fonksiyonel olarak rol oynayabileceği ifade edilmiştir(133).

Nir SeiderMD ve arkadaşları yaptıkları çalışmada YBMD hastalarından ve sağlıklı kontrol grubundan aldıkları kan örneklerinde haptoglobin seviyelerini kıyaslamıştır. Haptoglobin fenotipinin dağılımındaki çalışma ve kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. Bu bulgu, Hp 1-1 fenotipinin eksudatif YBMD'ye karşı koruyucu bir etkiye sahip olmadığı şeklinde yorumlanmıştır(134).Kliffen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada YBMD olan hastaların ve sağlıklı grubun makula dokusundaki protein analizi yapıp, sonuçlarında, Haptoglobin beta-zincirinin YBMD hastalarının makula dokusunda kontrol grubuna göre yüksek bulunduğu görülmüş olup, aynı zamanda ateroskleroz olan hastalarda yüksek bulunduğu gösterilmiş olan haptoglobin düzeylerinden yola çıkarak, ateroskleroz ile YBMD arasında bağlantı olabileceği ifade edilmiştir(135).

Bizim sonuçlarımızda Haptoglobin düzeyleri 4 farklı spot ile ifade edilmiştir. SSP 2104 numaralı spotta 14.85 kat, SSP 3006 numaralı spotta 4.43 kat, SSP 3007 numaralı spotta 9.3 kat ve son olarak SSP 3008 numaralı spotta ise 4.54 kat azalmış sonucuna varılmıştır. J.L.Ebersole ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Haptoglobinin inflamasyon durumlarında pozitif akut faz reaktanı olarak rol oynadığını ve sekonder olarak inflamasyonda arttığını

gösterilmiştir. (136)Bizim çalışmamızda, YBMD hastalarında Haptoglobin düzeylerinin düşük çıkması YBMD etyopatolojisinde rol oynayan inflamasyon ile çelişmektedir. Chi Feng Tseng ve arkadaşları Haptoglobinin insan plazmasında en önemli antioksidan rol oynayan proteinlerden biri olduğunu göstermişlerdir(137).YBMD etyolojisinde oksidatif stresin önemli rol oynadığı ve antioksidanların YBMD oluşumunu engellediğini gösteren çalışmalar ışığında(138), sonuçlarımızda haptoglobinin YBMD grubunda daha düşük çıkmasını oksidatif stres üzerinden antioksidan olarak rol alabileceğini düşündürmektedir.

Apolipoprotein E: Lipoprotein parçacıklarının bağlanması, içselleştirilmesi ve katabolizmasına aracılık eder. LDL (Apo B / E) reseptörü için bir ligand ve hepatik dokuların spesifik apo-E reseptörü (chylomicron remnant) olarak işlev görebilir(139). Apo E, plazmadaki tüm lipoprotein fraksiyonlarında bulunur. Çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (VLDL) % 10-20'sini ve yüksek yoğunluklu lipoproteinlerin (HDL) % 1-2'sini oluşturur. Apo E çoğu organda üretilmektedir. Karaciğer, beyin, dalak, akciğer, adrenal, yumurtalık, böbrek ve kaslarda önemli miktarlarda üretilir. ApoE ayrıca immünoregülasyon ve hücre büyümesi ve farklılaşması modülasyonu gibi lipit olmayan fonksiyonlara sahiptir. Karaciğer, beyin ve gözde yüksek miktarlarda üretilir. Retinada ve RPE, Bruch membranı ve koroidinde yüksek seviyelerde ApoE mRNA bulunabilir. İlginçtir ki, ApoE ayrıca drusen'in her safhasında bulunabilen bir bileşenidir(140).

19q13.2 kromozomunda yer alan ApoE için gen, üç majör alelik varyantla polimorfiktir: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$. Alzheimer hastalığı ve AMD de dahil olmak üzere çeşitli nörodejeneratif bozukluklarla ApoE polimorfizmlerinin genetik ilişkisi bildirilmiştir (141,142).ApoE polimorfizmi tanımlaması, neovasküler AMD'de optimal tedavi için bireyselleştirilmiş terapötik yaklaşımı uyarlamak için bir genetik tarama olarak kullanılabilir(143) İlginç bir şekilde, ApoE $\epsilon 4$ allelinin, AMD gelişmesine karşı koruyucu olduğu gösterilirken, E2 allelinin ise AMD gelişim riskini orta derecede arttırdığı gösterilmiştir. Determin E3 allel ise genellikle risk belirleme çalışmalarında temel kontrol olarak kullanılır.(143) İlginç bir şekilde, ApoE $\epsilon 4$ alleli AMD'de koruyucu iken Alzheimer hastalığı (AD) için artan risk ile korele olduğu, AMD de riski artırmış olduğu gösterilen ApoE'nin AD de riski arttırdığı görülmüştür (144). AD ve AMD'de allelik risk faktörlerinin zıt nedeninin, ApoE'nin, nöronlara karşı RPE'de kolesterol homeostazisini düzenlemede temel olarak farklı bir amaca hizmet ettiğini öne sürmektedir(145).

Bizim çalışmamızda Apo E'nin allellere bakılmamış olup, protein ekspresyon seviyesi değişiklik gösteren ve tanımlanan proteinlerden biri olarak karşımıza çıkmıştır. YBMD grubunda kontrol grubuna göre APO E düzeylerinin 3 kat up-regüle olduğu yani yüksek çıktığı gözlemlenmiştir. APOE nin YBMD grubunda kontrol grubuna göre yüksek çıkması bilinen immünoregülasyon, hücre büyümesi ve farklılaşması modülasyonu gibi görevlerine ek olarak anjiogenezde de rol alabileceğini düşündürmektedir.

Alpha crysallin A chain: Lensin saydamlığına ve kırılma indisine katkıda bulunur. Çok çeşitli stres koşullarında çeşitli proteinlerin agregasyonunu engelleyen şaperon benzeri aktiviteye sahiptir (146). Lensin bir protein agregasyon hastalığı olan katarakt, çözünür α -kristalin seviyeleri tükendiğinde ortaya çıktığı varsayılır(147). Bu nedenle, kataraktın başlangıcını geciktirmek için çözünür α -kristalin havuzunu yenileme stratejilerine ihtiyaç vardır. Benzer şekilde, bir dizi retinal dejeneratif hastalık, retinal hücre ölümüne neden olan yanlış katlanmış protein agregatlarının bir sonucudur(148).

Alfa-Kristalin retina, beyin, kas, dalak, akciğer ve cilt dahil olmak üzere birçok doku tipinden üretilir. Alfa -kristalin oksidatif stres tarafından düzenlenir ve anjiyogenez, apoptoz ve b-amiloid fibril oluşumunu engeller(149).

Alfa-Kristalin A Chain bizim bulgularımız sonucunda YBMD grubunda kontrol grubuna göre 779.54 kat down-regüle olduğu görülmüştür. Şaperon benzeri aktiviteye sahip olan ve anjiogenez, apoptoz oluşumunu engellediği gösterilmiş olan Alfa-Kristalin A Chain'in bizim bulgularımızda YBMD grubunda kontrol grubuna göre düşük çıkması YBMD etyopatogenezisinde rol oynayan anjiogenezinin önemini ortaya koymaktadır.

Beta-crystallin A3: Kristaller, omurgalı göz merceğinin baskın yapısal bileşenleridir. Kristalinlerin beyin, kalp, böbrek, akciğerler ve retina gibi diğer dokularda eksprese olduğu bilinmektedir (150).

Işık beta kristalin A3 ve A4'ün tirozin fosforilasyonunda belirgin bir artışa neden olur. Protein fosforilasyonları da görsel sinyallemede temel düzenleyici rollere sahiptir. Beta kristalinin fosforilasyonu RPE'de bir anti-apoptotik şaperon işlevini gösterir(151).

Bizim çalışmamızda Beta-crystallin A3 düzeyi YBMD grubunda kontrol grubuna göre 13.31 kat daha düşük bulunmuştur. Retinada lokalize olduğu gösterilmiş olan Beta-crystallin A3, anjiogenezisi engellediği şaperon ailesinden bir proteindir. Bu proteinin YBMD grubunda düşük seviyede çıkması, engellenemeyen anjiogenezisi ve şaperon görevini yerine getirememesini ve bunun sonucunda da oluşan patolojik agregatlar sonrasında YBMD oluşumuna katkı sağlayabileceğini düşündürmüştür. Güneş ışığına maruziyetin kendi başına YBMD için bir risk olabilmesine rağmen, güneş duyarlılığı da etkili bir faktör olabileceği kabul edilmektedir(152). Ayrıca retinayı ışık etkisinden koruyan Beta-crystallin A3 düzeyinin YBMD hastalarında sağlıklı gruba göre düşük çıkması da ışık etkisinin YBMD oluşumunda risk faktörü olduğuna kanıt olduğunu düşündürmektedir.

Beta-crystallin S: Kristaller, omurgalı göz merceğinin baskın yapısal bileşenleridir(124). Epitel morfogenezisi epitelin anatomik yapılarının üretildiği ve düzenlendiği süreç ile ilgilidir. Bir epitelyum, vücudun dış yüzeylerini örten veya herhangi bir iç boşluk veya tüpü çizen, bir veya daha fazla katmanda düzenlenmiş, sıkı şekilde paketlenmiş hücrelerden oluşur. Beta-Crystallin S, bir mol'e karşılık gelen 177 kalıntı uzunluğuna sahiptir. N-terminal serin tarafından bloke edilir. Kristalin ailesinin diğer üyeleri ile sekans karşılaştırması yapıldığında, insan gamma-kristalliniyle (% 53 özdeşlik) beta A3 / A1 kristalin (% 37 özdeşlik) ilişki ortaya konulmuştur.

β -kristalin proteinlerin birçoğu retinada rod ve koni fotoreseptör bölmelerine lokalize olduğu tespit edilmiştir. Fonksiyonel olarak, β -kristalinleri retinanın yoğun ışığa maruz kalmasından korunmasında rol oynar. Yaşa bağlı maküla dejenerasyonlu hastaların donör gözlerinin retinasından izole edilen drusen preparatlarında β -kristalin, CRYBB1 ve CRYBB2'nin iki üyesi tanımlanmıştır. Birlikte ele alındığında, CRYBB1 veya CRYBB2'deki mutasyonların YBMD duyarlılığını düzenlemede önemli bir rol oynadığını göstermediği şeklinde yorumlanmıştır(153).

Konjenital katarakt tipilerinden biri, Beta-crystallin S de(Catarakt 20-CTRCT20), temsil edilen geni etkileyen mutasyonlardan kaynaklanır. CTRCT20, ilerleyici polimorfik anterior, posterior veya periferik kortikal içerir. Morfolojide opasiteler değişir, sıklıkla lensin bir kısmıyla sınırlıdır ve statik veya progresif olabilir. Görme bozukluğu veya körlük ile sonuçlanan gözün kristalin lensinin opaklaşması durumu söz konusudur (154).

Bizim çalışmamızda, Beta-crystallin S YBMD grubunda kontrol grubuna göre 216.1 kat kadar daha az eksprese bulunmuştur. Sarah A. Hibbert ve arkadaşları Beta-crystallin S in güneş ışıklarına karşı antioksidan rol oynayarak koruyucu olduğunu göstermişlerdir(155). Beta-crystallin S düzeyinin YBMD grubunda bu kadar düşük çıkması YBMD etyolojisinde rol alabileceğini düşündürmekle beraber, retinayı yoğun ışığa karşı bilinen koruma görevi yanında ek olarak anjiyogenezis ve antioksidan rolleri olduğunu da göstermektedir. YBMD duyarlılığı konusunda önemli bir protein olduğunu düşündürmektedir.

Beta-crystallin B2: Kristaller, omurgalı göz merceğinin baskın yapısal bileşenleridir (124). Fabian Anders ve ark. erken glokom hastalığında Beta-crystallin B2 retina içindeki inversiyon durumunun net nöro-koruyucu etkileri olduğu ortaya konuldu. İntravitreal enjeksiyon sonrası göziçi basınç (GİB) yükselmesi sırasında β -kristalin B2'nin retinal ganglion hücre kaybını ($p < 0.05$), retinal sinir lifi tabakasını ($p < 0.05$) ve optik sinirin bozulmasını azalttığı bulunmuştur. Sonuç olarak, proteomik veriler, β -kristalin B2'nin apoptoz ve gen regülasyonu üzerine ciddi etkisi olan kalsiyuma bağlı hücre sinyal yollarını etkileyebileceğini göstermiştir(156).

Nöral progenitor cells (β B2-crystallin-NPCs) ler in vivo olarak distal optik sinir kütüğü içinde kesilmiş optik sinir aksonlarının rejenerasyonunu desteklediği gösterilmiştir. Rapor edilen veriler, β B2-kristalin üreten "hücre fabrikalarının" merkezi sinir sistemi yaralanmaları için yeni terapötik ilaçlar sağlamak için kullanılabilirliğini göstermektedir(157). Böhm MR ve ark. Retina ganglion hücresi denegerasyonuna RPE cevabının, terapötik olarak kullanılabilen β -kristalin B2 ler aracılığı ile aracılık ettiğini bu nedenle düşünmektedirler(158).

Bizim çalışma verilerimizde Beta-crystallin B2, YBMD grubunda kontrol grubuna göre 232.19 kat daha düşük seviyede bulunmuştur. Retinada nöro koruyucu etkisi olduğu ortaya konulmuş olan Beta-crystallin B2'nin YBMD grubunda düşük bulunması beklenen ve bu etkiyi destekler bir sonuç olduğunu göstermektedir. Ayrıca, YBMD etyopatolojisinde ve yeni tedavi modaliteleri konusunda diğer Kristallin üyeleri gibi Beta-crystallin B2 de umut ışığı olabilir.

Alpha-crystallin B chain: Lensin saydamlığına ve kırılma indisine katkıda bulunabilir. Çok çeşitli stres koşullarında çeşitli proteinlerin agregasyonunu önleyerek şaperon benzeri aktiviteye sahiptir(124). Alfa-kristalin oksidatif stres tarafından düzenlenir ve anjiyogenez,

apoptoz ve b-amiloid fibril oluşumunu engeller (149).Lens ve miyokardiyal dokularda üretilir (159). Isı şoku protein ailesi üyelerinden biri olan alphaB-kristalin, moleküler şaperonların ve anti-apoptotik etkilerin biyolojik özelliklerine sahiptir. Retinopati, inflamasyon ve sinir sistemi hastalıkları gibi çok faktörlü yaralanmalar, alfa-kristalin ile yakın ilişki içerisinde (160).

Alpha-crystallin B chain; AMD, diyabetik retinopati, üveit gibi hastalıklar, oküler travma ve iskemi olmak üzere geniş bir retinal hastalık yelpazesinde yer alır(161). Son zamanlarda, Alpha-crystallin B chain'in bir mitokondri-aracılı apoptozun önemli düzenleyicisi ve anti-inflamatuar özelliklere olduğu gösterilmiştir. Alpha-crystallin B chain Retina pigmentin Epitelinde (RPE) oksidatif stresin neden olduğu apoptozu inhibe eder. Hayvan modelinde retinal dejenerasyonun ilerlemesini inhibe ettiği gösterilmiştir(162).

YBMD patogenezinde moleküler değişikliklerin katkısı açıktır, ancak bu etkinin ardındaki mekanizma yeterince anlaşılmamıştır. Alfa- Kristalin B Chain, YBMD ile ilgili olduğu ve bazı yazarlar tarafından YBMD patogenezinde biyobelirteç olarak kullanılması önerilmiştir (163).Alfa-kristalin B Chain knockout farelerinde RPE çalışmaları göstermiştir ki Alfa-kristalin B Chain vasküler endotelial büyüme faktörü ile etkileşim yoluyla (VEGF) retinal ve koroidal anjiyogenezi destekler(164).Kronik stres Alfa-kristalin B Chain seviyesini azaltabilir ve bu değişiklik dejeneratif süreçleri teşvik edebilir (165,166).Kase ve arkadaşları yaptıkları çalışmada anjiyogeneze rol oynayan VEGF-A için bir şaperon olarak Alfa-kristalin B Chain in önemli bir rol oynadığını ve terapötik bir hedef olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymuşlardır. Alfa-kristalin B Chain, oküler anjiyogenesinin iyi bilinen 2 modelinde anjiyojenik yanıtın düzenlenmesinde kritik bir rol oynar(167).

Alfa-Kristalin B Chain bizim bulgularımız sonucunda YBMD grubunda kontrol grubuna göre 214.35 kat down-regüle olduğu görülmüştür. Şaperon benzeri aktiviteye sahip olan ve anjiyogeneze, apoptoz oluşumunu engellediği gösterilmiş olan Alfa-Kristalin B Chain in bizim bulgularımızda YBMD grubunda kontrol grubuna göre düşük çıkması hastalık etyopatogenezinin destekler bir sonuçtur ve yeni tedavi modaliteleri konusunda umut ışığı olabileceğini düşündürmektedir. Kronik stresin de Alfa-Kristalin B Chain düzeylerini azalttığı ve dejeneratif süreci teşvik ettiği gösterilmiş olduğu başka çalışmalarda da(165,166) gösterildiği gibi YBMD gibi dejeneratif bir hastalıkta rol alabileceğini akla getirmektedir

İmmunoglobulin kappa constant: İmmunoglobulin ağır zincirlerinin sabit bölgesi. Antikor olarak da bilinen immünoglobulinler, B lenfositleri tarafından üretilen membrana bağlı veya salgılanmış glikoproteinlerdir. Hümorale immünitenin tanınması aşamasında, membrana bağlı immünoglobulinler, spesifik bir antijenin bağlanması üzerine, B lenfositlerinin immünoglobulinleri salgılayan plazma hücrelerine klonal genişlemesini ve farklılaşmasını tetikleyen reseptörler olarak hizmet eder(168).

İmmunoglobulin kappa constant protein, hücre proliferasyonu ve ölümü ve metabolik fonksiyonun kontrolü de dahil olmak üzere, gözün retinası içinde bir iç dengenin korunmasında yer alan bir doku homeostatik prosesi yolağına dahildirler (169).

İmmunoglobulin kappa constant bizim çalışmamızda YBMD grubunda 36.23 kat daha düşük bulunmuştur. Retina iç dengesinin korunmasında(169) rol alan İmmunoglobulin kappa constant seviyesinin YBMD hastalarında az olması etyopatolojisinde rol alabileceğini düşündürmektedir.

Hastalıkların patogenezi anlamada kullanılan proteomik verileri sistem biyolojisi yaklaşımı ile incelemek daima avantajlı olup, görülen değişimlerin organizmayı hangi moleküler düzeyde etkilediğini göstermektedir. Biz de bu amaçla elde ettiğimiz verileri biyoinformatik araçlar kullanarak değerlendirdik. Yaptığımız PANTHER analizinde seviyelerinde değişiklik gördüğümüz proteinlerin daha ziyade bağlama ve katalitik aktivite gösteren proteinler olduğunu ve birçok farklı proseste rol alabileceklerini gördük. Buradan çıkardığımız sonuç, bu proteinlerin multifonksiyonel proteinler olup organizmanın metabolizmasında merkezi rol oynadıkları gerçeğidir. PANTHER analizi bize özellikle seviyesinde ileri derecede değişim gözlemlendiğimiz alpha kristalin proteininin iki önemli biyolojik proseste etkili bir rol aldığını gösterdi. Bu prosesler anjiyogenezis ve VEGF sinyal yollarıdır. Alpha kristalin proteinine ait interaktom haritası çıkarabilmek için yaptığımız BioGrid analizinde bu proteinin çok sayıda proteinle etkileştiğini ve birçok farklı metabolik yolağı kontrol ettiğini gördük. Araştırmamızı bir ileri seviyeye çekip STRING yazılımı ile

derinleştirdiğimizde ise sekiz farklı biyolojik prosesin hastalık patogenezinde etkili olabileceği gösterildi. Aynı analiz metodu ile bulunan proteinlerin ve bu proteinlerin etkileştiği proteinlerin gözün yapısal öğelerinden olduğu veya bu öğelerin oluşumunda etki ettiği gösterildi. Tanımlanan proteinlerin hücre içi durumları değerlendirildiğinde beş farklı hücre komponentinin parçası oldukları tespit edildi. Bunlar içerisinde en ne çıkan ve dikkatimizi çeken moleküler olay endozitoz ve plazma lipoprotein particule clearance olaylarıdır. Bu nedenle bu hastalığın patolojisinin daha derinlemesine yapılabilmesi için çalışma modalitesi tasarlanması ve endositik yolak atıvitesinin derinlemesine araştırılması gerekmektedir.

6. SONUÇ

Neovasküler tip YBMD tanısı konulan daha önce enjeksiyon tedavisi almamış ve ek retinal, sistemik hastalığı olmayan hastalar ile sağlıklı kontrol grubunun alınan vitreus örneklerinin protein içeriği proteomiks yöntemiyle kıyaslanarak YBMD etyopatolojisi ve olabilecek yeni tedavi hedefleri araştırılmıştır. YBMD ve sağlıklı kontrol grubunun vitreus örneklerinin yapılan karşılaştırmalı proteom analizinde 11 protein spotunda regülasyon varlığı tespit edilmiştir. Kontrol grubuna göre YBMD grubunda Alfa 1-asit glikoprotein (AAG), Leucine-rich alpha-2-glycoprotein(LRG-1), Alpha-2-HS-glycoprotein, Haptoglobin, Alfa-Kristalin A Chain, Alfa-Kristalin B Chain, Immunoglobulin kappa constant, Beta-crystallin B2, Beta-crystallin A3, Beta-crystallin S düzeylerinde azalma, Apolipoprotein E(APO-E) düzeyinde artma görüldü.

Elde edilen veriler, yapılan biyoinformatik analizler ile birleştirildiğinde YBMD gelişiminde rol alan VEGF ve mediyatörleri dışında bahsettiğimiz proteinlerin de etkili olabileceği görülmüştür. Bu yapısal proteinlerin seçici regülasyonunun etyopatolojide yeni fikirler verebileceği gibi buna bağlı olarak da tedavi modaliteleri geliştirme konusunda da umut ışığı olabileceği düşünülmektedir.

YBMD' nın günümüzdeki tedavisi ve YBMD tanılı insan vitreus modellerinin proteomiks çalışmalarının literatürdeki sayıları kısıtlıdır. Bu çalışma literatüre bu anlamda önemli bir katkı sağlamakla birlikte, bu hastalığın patolojisinin daha derinlemesine anlaşılabilmesine olanak sağlayacak hedefli çalışmalara da öncüllük edecektir.

6.ÖZETLER

YAŞA BAĞLI MAKÜLA DEJENERASYONU OLAN HASTALARDA VİTREUS ÖRNEKLERİNDEKİ PROTEİN İÇERİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Amaç ve Kapsam: Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu olan hastalarda hastalığın olası patogenezi ve yeni tedavi yöntemleri gelişimi konusunda protein içeriği proteomik yolla incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 13 hasta YBMD grubu, 11 hasta sağlıklı kontrol grubu olarak iki grup oluşturuldu.İki gruptan da steril şartlarda ve kontamisyona dikkat edilerek vitreus örnekleri alınarak proteomiks analizi yapılması amacıyla proteomiks laboratuvarına verildi.

Bulgular: Proteomiks analizi sonucunda kontrol grubuna göre YBMD grubunda Alfa 1-asit glikoprotein (AAG), Leucine-rich alpha-2-glycoprotein(LRG-1), Alpha-2-HS-glycoprotein, Haptoglobin, Alfa-Kristalin A Chain, Alfa-Kristalin B Chain, Immunoglobulin kappa constant, Beta-crystallin B2, Beta-crystallin A3, Beta-crystallin S düzeylerinde azalma, Apolipoprotein E(APO-E) düzeyinde artma görüldü.

Sonuç: Elde edilen veriler, yapılan biyoinformatik analizler ile birleştirildiğinde YBMD gelişiminde rol alan VEGF ve mediyatörleri dışında bahsettiğimiz proteinlerin de etkili olabileceği görülmüştür. Bu yapısal proteinlerin seçici regülasyonunun etyopatolojide yeni fikirler verebileceği gibi buna bağlı olarak da tedavi modaliteleri geliştirme konusunda da umut ışığı olabileceği düşünülmektedir. YBMD' nın günümüzdeki tedavisi ve YBMD tanılı insan vitreus modellerinin proteomiks çalışmalarının literatürdeki sayıları kısıtlıdır. Bu çalışma literatüre bu anlamda önemli bir katkı sağlamakla birlikte, bu hastalığın patolojisinin daha derinlemesine anlaşılabilmesine olanak sağlayacak hedefli çalışmalara da öncüllük edecektir.

7.ABSTARCTS

QUANTITATIVE PROTEOMIC ANALYSIS OF VITREOUS IN AGE RELATED MACULAR DEGENERATION

Objective: The aim of this study was to investigate the protein content of patients with age-related macular degeneration for possible pathogenesis and development of new treatment modalities.

Materials and Methods: Two groups were formed as 13 patients with AMD and 11 patients with healthy control group. Vitreous samples were taken from both groups under sterile conditions and given to proteomics laboratory for proteomics analysis.

Results: According to proteomics analysis, Alpha 1-acid glycoprotein (AAG), Leucine-rich alpha-2-glycoprotein (LRG-1), Alpha-2-HS-glycoprotein, Haptoglobin, Alpha-Crystalline A Chain, Alpha - Crystalline B Chain, Immunoglobulin kappa constant, Beta-crystalline B2, Beta-crystalline A3, Beta-crystalline S levels decreased, Apolipoprotein E (APO-E) levels increased in AMD group.

Conclusion: When the data obtained were combined with bioinformatics analysis, it was seen that the proteins mentioned above could be effective in addition to VEGF and mediators involved in the development of AMD. It is thought that the selective regulation of these structural proteins may give new ideas in etiopathology, and consequently, there may be hope for developing treatment modalities. The current treatment of AMD and proteomics studies of human vitreous models diagnosed with AMD are limited in the literature. Although this study makes an important contribution to the literature in this respect, it will also lead to targeted studies that will enable a deeper understanding of the pathology of this disease.

8. KAYNAKÇA

1. Börümcek EY. Yaşa Bağlı Maküla Dejeneresansında Risk Faktörleri. 28. Ulusal Oftalmoloji Kursu; Retina “Güncel Tanı ve Tedavi”. Ankara-Türkiye, 11–13 Nisan 2008: 23-28.
2. Ngai LY, Stocks N, Sparrow JM, ve ark. The prevalence and analysis of risk factors for age-related macular degeneration: 18-year follow-up data from the Speedwell eye study, United Kingdom. *Eye*. 2011; 25(6): 784–93.
3. Friedman DS, O’Colmain BJ, Muñoz B, ve ark. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol*. 2004; 122(4): 564-72.
4. Seddon JM, Sobrin L. Epidemiology of age-related macular degeneration. In: Albert D, Miller J, Azar D, Blodi B, eds. *Albert & Jakobiec’s Principles and Practice of Ophthalmology*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2007: 413–422.
5. Wong TY, Chakravarthy U, Klein R, ve ark. The natural history and prognosis of neovascular age-related macular degeneration a systematic review of the literature and meta-analysis. *Ophthalmol*. 2008; 115(1): 116–126.
6. Macular Photocoagulation Study Group. Subfoveal neovascular lesions in age-related macular degeneration: guidelines for evaluation and treatment in the Macular Photocoagulation Study. *Arch Ophthalmol* 109:1242-1257
7. Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy Study Group; Verteporfin in Photodynamic Therapy Study Group. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization with verteporfin: fluorescein angiographic guidelines for evaluation and treatment--TAP and VIP report No. 2. *Arch Ophthalmol*. 121:1253- 1268,2003
8. Schwesinger C, Yee C, Rohan RM, et al. Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol*. 2001;158(3):1161–1172
9. Sreekumar PG, Zhou J, Sohn J, et al. N-(4-hydroxyphenyl) retinamide augments laser-induced choroidal neovascularization in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(3):1210–1220
10. Andreoli CM, Miller JW. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for ocular neovascular disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2007;18(6):502–508
11. New Treatment Modalities for Neovascular Age-Related Macular Degeneration Patricio G. Schlottmann, MD,* Arturo A. Alezzandrini, MD, PhD, Marcelo Zas, MD, PhD, Francisco J. Rodriguez, MD, José D. Luna, MD, and Lihteh Wu, MD *Asia-Pac J Ophthalmol* 2017;6:514–519
12. Chapman K. The ProteinChip Biomarker System from CIPHERGEN Biosystems: a novel proteomics platform for rapid biomarker discovery and validation. *Biochem Soc Trans*. Apr 2002;30(2):82-87.
13. Snell RS, Lemp MA. *Clinical Anatomy of the Eye*. 2nd ed: Blackwell Science Ltd.; 2013.
14. Tripathi R, Wond M. *Basic and Clinical Science Course Section 2: Fundamentals and Principles of Ophthalmology* 2014.
15. Özdemir H, Arf S, Karaçorlu M. Maküla Hastalıklarında Optik Koherens Tomografi. 2015:3-.
16. American Academy of Ophthalmology, Basic and Science Course, Section 12: Retina and Vitreous 2008:7-18,20-21

17. American Academy of Ophthalmology, Basic and Science Course, Section 12: Retina and Vitreous 2008:7-18,20-21

18. Leibowitz HM, Krueger DE, Maunder LR, et al. The Framingham Eye Study Monograph: an ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975. *Surv Ophthalmol.* 1980; 24: 335-610.

19. Klein R, Klein BE, Jensen SC, Meuer SM. The 5 year incidence and progression of age related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmol.* 1997; 104(1): 7-21.

20. Varma R, Foong WPA, Lai MY, et al. Four year incidence and progression of age-related macular degeneration: The Los Angeles Latino Eye Study. *Am J Ophthalmol.* 2010; 149: 741-751.

21. Rahmani B, Tielsch JM, Katz J, et al. The cause specific prevalence of visual impairment in an urban population - the Baltimore Eye Survey. *Ophthalmol.* 1996; 103(11): 1721-6.

22. Young RW. Visual cells and the concept of renewal. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1976; 15: 42-75.

23. Boulton M, Marshall J. Effects of increasing numbers of phagocytic inclusion on human retinal pigment epithelial cells in culture: a model for aging. *Br J Ophthalmol* 1986; 70: 808-15

24. Feeney-Burns L, Hilderbrand ES, Eldridge S. Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial and peripheral cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1984; 25: 195-200.

25. Sundelin SP, Wihlmark U. Lipofuscin accumulation in cultured retinal pigment epithelial cells reduces their phagocytic capacity. *Curr Eye Res* 1998;17:851-57.

26. Kennedy CJ, Rakoczy PE, Constable IJ. Lipofuscin of the retina pigment epithelium: A review. *Eye* 1995;9:763-771.

27. Cour M, Kiilgaard J, Nissen M. Age-related macular degeneration. *Epidemiology and optimal treatment. Drugs aging* 2002;19:101-133.

28. Mullins RF, Sohn EH. Bruch's Membran: The Critical Boundary in Macular Degeneration. In: Ying GS, ed. *Age Related Macular Degeneration – The Recent Advances in Basic Research and Clinical Care: InTech;* 2012:300.

29. Age-Related Macular Degeneration: From One Medical Student to Another Jaelyn Haugsdal and Elliott Sohn, MD April 26, 2013

30. Ramrattan RS, van der Schaft TL et al. Morphometric analysis of the Bruch's membrane, the choriocapillaris and the choroid in ageing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:2857-64.

31. Grunwald J, Hariprasad S, Dupont J. Effect of aging on foveolar choroidal circulation. *Arch Ophthalmol.* 1998;116:150-154. 66

32. Guymer R, Luthert P, Bird A. Changes in Bruch's membrane and related structures with age. *Prog Retin Eye Res.* 1999;18:59-90.

33. Korte GE, Burns MS, Bellhorn RW. Epithelium-capillary interactions in the eye: the retinal pigment epithelium and the choriocapillaris. *Int Rev Cytol.* 1989; 114:221-248.

34. Marshall J. The aging retina: physiology or pathology. *Eye* 1987;1:282-295.

35. Friedman E. A hemodynamic model of the pathogenesis of age related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 1997;124:677-682.

36. Funk RW, Rohen JW. Comparative morphological studies on blood vessels of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Exp Eye Res* 1985;40:191-203.

37. McCumber RW, Flower RW, Langham ME. Ischemic hypertensive choroidopathy: Fluorescein angiography, ICG angiography and measurements of pulsatile blood flow. *Arch Ophthalmol* 1993;11:704-5.

38. R. C. Rose, S. P. Richer, and A. M. Bode, "Ocular oxidants and antioxidant protection," *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 217, no. 4, pp. 397–407, 1998.
39. B. S. Winkler, M. E. Boulton, J. D. Gottsch, and P. Sternberg, "Oxidative damage and age-related macular degeneration," *Molecular Vision*, vol. 5, p. 32, 1999.
40. Janusz Blasiak, Goran Petrovski, Zoltán Veréb, Andrea Facskó, and Kai Kaarniranta Oxidative Stress, Hypoxia, and Autophagy in the Neovascular Processes of Age-Related Macular Degeneration *BioMed Research International* Volume 2014 (2014), Article ID 768026, 7
41. D. M. Schneeweis and J. L. Schnapf, "Photovoltage of rods and cones in the macaque retina," *Science*, vol. 268, no. 5213, pp. 1053–1056, 1995.
42. B. S. Rogers, R. C. Symons, K. Komeima et al., "Differential sensitivity of cones to iron-mediated oxidative damage," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 48, no. 1, pp. 438–445, 2007.
43. S. Beatty, H. Koh, M. Phil, D. Henson, M. Boulton The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration *Survey of Ophthalmology*, 45 (2000), pp. 115–134
44. Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou L, Darrow RA, Kutty RK, Kutty G, Wiggert B. Light history and age-related changes in retinal light damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998 Jun;39(7):1107-16.
45. Miller YI, Choi SH, Wiesner P, et al. Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circ Res*. 2011;108:235-48.
46. Seddon JM, Ajani UA, Sperduto RD, Hiller R, Blair N, Burton TC, Farber MD, Gragoudas ES, Haller J, Miller DT, et al. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. *JAMA*. 1994 Nov 9;272(18):1413-20.
47. Smith W, Mitchell P, Webb K, Leeder SR. Dietary antioxidants and age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 1999;106(4):761-767.
48. Eye Disease Case-Control Group. Antioxidant status and neovascular age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 1993;111(1):104-9.
49. Cohen SM, Olin KL, Feuer WJ, Hjelmeland L, Keen CL, Morse LS. Low glutathione reductase and peroxidase activity in age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. 1994 Oct;78(10):791-4.
50. Miller YI, Choi SH, Wiesner P, et al. Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circ Res*. 2011;108:235-48.
51. Snow K, Seddon J. Do age related macular degeneration and cardiovascular disease share common antecedents? *Ophthalmic Epidemiol* 1999;6:125–143.
52. Seddon JM, Gensler G, Milton RC, Klein ML, Rifai N. Association between C-reactive protein and age-related macular degeneration. *JAMA* 2004;291:704–710.
53. Seddon JM, George S, Rosner B, Rifai N. Progression of age-related macular degeneration: prospective assessment of C-reactive protein, interleukin-6, and other cardiovascular biomarkers. *Arch Ophthalmol* 2005;123:774–782.
54. Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol* 2002;134:411–431
55. Kaarniranta K, Salminen A, Haapasalo A, Soininen H, Hiltunen M. Age-related macular degeneration (AMD): Alzheimer's disease in the eye? *J Alzheimers Dis* 2011; 24(4):615-31; PMID:21297256
56. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669–676
57. Ebrahimi KB, Handa JT. Lipids, lipoproteins, and age-related macular degeneration. *J Lipids*. 2011;2011:802059. doi: 10.1155/2011/802059.
58. Nowak JZ. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacol Rep* 2006;58:353–63.
59. Zhou J, Jang YP, Kim SR, Sparrow JR. Complement activation by photooxidation products of A2E, a lipofuscin constituent of the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(44):16182–7.
60. Radu RA, Hu J, Yuan Q, Welch DL, Makshanoff J, Lloyd M, et al. Complement system dysregulation and inflammation in the retinal pigment epithelium of amouse model for Stargardtmacular degeneration. *J Biol Chem* 2011;286(21): 18593–601.

61. Boldt HC, Bressler SB, Fine SL, et al. Age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol* 1990;1:247-57.
62. Sarks JS, Sarks SH, Killingworth MC. Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. *Eye* 1988;2:552-77.
63. Feeney-Burns L, Burns RP, Gao CL. Age-related macular changes in humans over 90 years old. *Am J Ophthalmol* 1990;109:265-78.
64. Hogan MJ: Role of retinal pigment epithelium in macular disease. *Trans Am Acad ophthalmol Otolaryngol* 1972;76:64-80. *tol* 32 :146, 2000
65. Tso MOM: Pathogenetic Factors of Aging macular degeneration. *Ophthalmol* 1985;92:628-35.
66. Friedman E, Smith TR, Kuwabara T: Senile choroidal vascular patterns and drusen. *ArcOphthalmol* 1963;69:220-30.
67. Johnson, L. V., Ozaki, S., Staples, M. L., Erickson, P. A. & Anderson, D. H. (2000) *Exp. Eye Res.* **70**, 441–449.
68. Treins, C., Giorgetti-Peraldi, S., Murdaca, J. & Van Obberghen, E. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 43836–43841.
69. Okamoto, T., Tanaka, S., Stan, A. C., Koike, T., Kase, M., Makita, Z., Sawa, E. & Nagashima, K. (2002) *Microvasc. Res.* **63**, 186–195.
70. Boldt HC, Bressler SB, Fine SL, et al. Age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol* 1990;1:247-57.
71. Klein R, Klein BE, Linton KL. Prevalence of age-related macular maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 1992; 99:933-43
72. Bressler SB, Maguire NG, Bressler NM, Fine SL. The Macular Photocoagulation Study Group. Relationship of drusen and abnormalities of the retinal pigment epithelium to the prognosis of neovascular macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 1990; 1442-47
73. Mukesh BN, Dimitrof PN, Leikin S, Wang JJ, Mitchell P, Mccarty CA, Taylor HR. Fiveyear incidence of age-related maculopathy:The Visual Impairment Project. *Ophthalmology* 2004; 111:1176-82.
74. Arnold JJ, Quaranta M. Indocyanine green angiography of drusen. *Am J Ophthalmol* 1997; 124:344-356
75. Sarks S, Sarks J. Age-Related Maculopathy: Nonneovascular Age Related Macular Degeneration and the Evolution of Geographic Atrophy. *Retina* Volume 2. Ryan S.J. Los Angeles. Mosby. 2001:1064- 1099
76. Bressler NM, Maguire MG, Bressler SB, et al. Relationship of drusen and abnormalities of the retinal pigment epithelium to the prognosis of neovascular macular degeneration: the Macular Photocoagulation Study Group. *Arch Ophthalmol* 1990;108:442-7.
77. Sunnes JS, Rubin GS, Applegate CA, et al. Enlargement of atrophy and visual acuity loss in geographic atrophy form of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 1997;106:1768-79
78. Saperstein DA, Grossniklaus HE, Rezaei K, Bustros B. Age-Related Macular Degeneration. In: Sternberg P Jr, Ed. *AAO Learning Management System* San Francisco, CA: American Academy of Ophthalmology; 2006 Erişim: http://lms.aaopt.org/lms_one/index.php Erişim tarihi: 12.04.2009.
79. Pesce A, Santiago F, Gree WR. Histopathology of age-related macular degeneration. In: Alfaro DV, Liggett PE, Mieler WF, Quiroz-Mercado H, Jager RD, Tano Y, Eds. *Age-Related Macular Degeneration*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2006: 40–43.
- 80- Bressler SB Maguire MG Bressler NM Fine SL. The Macular Photocoagulation study grup the relationship of drusen and abnormalities of RPE to the prognosis of ARMD. *Arch Ophthalmol* 1990;108:1442-1447
81. Coscas G, Soubrane G, Ramahefasolo C, Fardeau C: Perifoveal laser treatment for subfoveal choroidal new vessels in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 1991;109:1258-65.
82. Yanuzzi LA, Slakter JS, Sorenson JA, Guyer DR, Orlock DA: Digital indocyanin green videoangiography and choroidal neovascularisation. *Retina* 1992; 12:191
83. Akbatur HH: Subretinal neovasküler membranlar. *Ret-Vit* 1998; 6:74-9.
84. Gass JDM: Serous retinal pigment epithelial detachment with notch.: a sign of occult choroidal neovascularization. *Retina* 1984;4:205-220.
85. Age-related Eye Disease Study research group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamin C and E, beta carotene, and zinc for age related macular degeneration and vision loss: AREDS Report No. 8. *Arch*

- Ophthalmol 2001; 119: 1417-1436.
86. Age-related Eye Disease Study research group, San Giovanni JP, Chew EY, et al. The relationship of dietary carotenoid and vitamin A, E, and C intake with age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS Report No. 22. Arch Ophthalmol 2007; 125(9): 1125-1132.
87. Parekh N, Chappell RJ, Millen AE, et al. Association between vitamin D and age-related macular degeneration in the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988 through 1994. Arch Ophthalmol 2007; 125(5): 661-669.
88. Richter S, Stiles W, Statkute L, et al. Double masked, placebo controlled randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the prevention of AMD: the Veterans LAST study. Optometry 2004; 75: 216-230.
89. Rehak M, Fric E, Wiedemann P. Lutein and antioxidants in the prevention of age-related macular degeneration. Ophthalmologie 2008; 105(1): 37-45.
90. Chua B, Flood V, Rochtchina E, et al. Dietary fatty acids and the 5-year incidence of age-related maculopathy. Arch Ophthalmol 2006; 124: 981-986.
91. Tan JS, Wang JJ, Flood V, et al. Dietary antioxidants and the long term incidence of age-related macular degeneration: The Blue Mountains Eye Study. Ophthalmology 2008; 115(2): 334-341.
92. Virgili G, Novelli N, Menchini F, et al. Pharmacological treatments for neovascular age-related macular degeneration: can mixed treatment comparison meta-analysis be useful? Curr Drug Targets. 2011; 12(2): 212-20.
93. Mortality associated with bevacizumab intravitreal injections in age-related macular degeneration patients after acute myocardial infarct: a retrospective population-based survival analysis Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology (2018) 256:651–663
94. Saperstein DA, Grossniklaus HE, Rezaei K, Bustros B. Age-Related Macular Degeneration. In: Sternberg P Jr, Ed. *AAO Learning Management System* San Francisco, CA: American Academy of Ophthalmology; 2006
Erişim: http://lms.aao.org/lms_one/index.php Erişim tarihi: 12.04.2009.
95. Incidence of ocular hypertension after intravitreal injection of anti-VEGF agents in the treatment of neovascular AMD *Romanian Journal of Ophthalmology, Volume 61, Issue 3, July-September 2017. pp:207-211*
96. Gonzales CR; VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization (V.I.S.I.O.N.) Clinical Trial Group. Enhanced efficacy associated with early treatment of neovascular age-related macular degeneration with pegaptanib sodium: an exploratory analysis. *Retina* 2005;25:815–827.
97. Karaçorlu M, Karaçorlu SA, Özdemir H. *Koroid Neovaskülarizasyonları ve Fotodinamik Tedavi*. 1. Baskı, İstanbul: İstanbul Retina Enstitüsü **2006**: 5–16.
98. Kaiser PK, Blodi BA, Shapiro H, Acharya NR; MARINA Study Group. Angiographic and optical coherence tomographic results of the MARINA study of ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2007;114:1868–1875.
99. Age-Related Macular Degeneration: New Paradigms for Treatment and Management of AMD Received 29 July 2017; Accepted 6 December 2017; Published 1 February 2018
100. Lu X, Sun X. Profile of conbercept in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Drug Des Devel Ther.* 2015(9):2311–2320.
101. Li X, Xu G, Wang Y, et al. Safety and efficacy of conbercept in neovascular age-related macular degeneration: results from a 12-month randomized phase 2 study: AURORA study. *Ophthalmology.* 2014;121(9):1740–1747.
102. Ming Z, Zhang J, Mi Y, et al. A phase 1 study of kh902, a vascular endothelial growth factor receptor decoy, for exudative age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2010;118(4):672–678.
103. Platelet derived growth factor inhibitors: a potential therapeutic approach for ocular neovascularization. *Saudi J Ophthalmol.* 2015;29:287–291
104. New Treatment Modalities for Neovascular Age-Related Macular Degeneration *Asia-Pac J Ophthalmol* 2017;6:514–519
105. Phase 1 trial of anti-vascular endothelial growth factor/antiangiopoietin 2 bispecific antibody RG7716 for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmol Retin.* May 23, 2017
106. Phase 1 study of combination therapy with neovascular endothelial growth factor inhibitor and aflibercept for neovascular AMD and diabetic macular edema. Paper presented at: American Academy of Ophthalmology Annual Meeting; October 14–18, 2016
107. Chapman K. The ProteinChip Biomarker System from Ciphergen Biosystems: a novel proteomics platform for rapid biomarker discovery and validation. *Biochem Soc Trans.* Apr 2002;30(2):82-87.
108. Etzioni R, Urban N, Ramsey S, et al. The case for early detection. *Nat Rev Cancer.* Apr 2003;3(4):243-
109. Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to

- clinical utility. *Nat Biotechnol.* Aug 2006;24(8):971-983.
110. G M-V. *Proteomics principles and Challenges* 2004.
111. Moore CA, Khoury MJ, Bradley LA. From genetics to genomics: using gene-based medicine to prevent disease and promote health in children. *Semin Perinatol.* Jun 2005;29(3):135-143.
112. Weber K, Pringle JR, Osborn M. Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods Enzymol.* 1972;26:3-27.
113. Washburn MP, Wolters D, Yates JR, 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol.* Mar 2001;19(3):242-247.
114. Risk Factors and Biomarkers of Age-Related Macular Degeneration , *Prog Retin Eye Res.* 2016 Sep; 54: 64–102. Published online 2016 May 6. doi: [10.1016/j.preteyeres.2016.04.003](https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2016.04.003)
115. Stefansson E (2009) Physiology of vitreous surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 247: 147–163
116. Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Archives of Ophthalmology* 114: 66–71.
117. Neovascular age-related macular degeneration: intraocular cytokines and growth factors and the influence of therapy with ranibizumab. *Ophthalmology* 116: 2393–2399.5. Grossniklaus HE, Green WR (2004)
118. Choroidal neovascularization. *Am J Ophthalmol* 137: 496–503.6. Kim TW, Kang JW, Ahn J, Lee EK, Cho KC, et al. (2012)
119. Proteomic analysis of the aqueous humor in age-related macular degeneration (AMD) patients. *Journal of proteome research* 11: 4034–4043
120. Selective binding of imatinib to the genetic variants of human alpha1-acid glycoprotein." *Biochim. Biophys. Acta* 1760:1704-1712(2006)
121. Acute phase serum proteins in diabetic retinopathy *Indian J Ophthalmol.* 1996 Jun;44(2):83-5.
122. Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics 2009 Nov;8(11):4889-905. doi: [10.1021/pr900686s](https://doi.org/10.1021/pr900686s).
123. Serum alpha-1 acid glycoprotein levels in acute idiopathic anterior uveitis *Ann Ophthalmol.* 1991 Nov;23(11):406-9)
124. UniProt: the universal protein knowledgebase: The UniProt Consortium.
125. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGFβ signalling, *John Greenwood Nature.* 2013 Jul 18; 499(7458): [10.1038/nature12345](https://doi.org/10.1038/nature12345).doi: [10.1038/nature12345](https://doi.org/10.1038/nature12345)
126. Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A. *Biochem J*, 2003; 376: 135–45
127. Alpha2-HSG, a specific inhibitor of insulin receptor autophosphorylation, interacts with the insulin receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 2000; 164: 87–98)
128. Relation of Serum and Vitreous Concentrations of Fetuin-A with Diabetic Natural Science Fund Project in Shandong Province
129. Serum concentration of human alpha 2 HS glycoprotein during the inflammatory process: evidence that alpha 2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant. 1979 Oct; 64(4): 1118–1129.
130. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer." *Fasano A. Physiol. Rev.* 91:151-175(2011)
131. Acute phase serum proteins in diabetic retinopathy *Indian J Ophthalmol.* 1996 Jun;44(2):83-5
132. Concentration of acute phase factors in vitreous fluid in diabetic macular edema *J Ophthalmol* (2017) 61:479–483 DOI [10.1007/s10384-017-0525-x](https://doi.org/10.1007/s10384-017-0525-x)

133. Haptoglobin phenotypes in diabetes mellitus and diabetic retinopathy 1991;41(5):347-50
134. Haptoglobin phenotype in age-related macular degeneration patients Am J Ophthalmol 2003 Nov;136(5):911-4
135. Protein analysis of human maculae in relation to age-related maculopathy 1995 Aug;73(2):267-72)
136. Systemic acute-phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin, in adult periodontitis
137. Antioxidant role of human haptoglobin Chi Feng Tseng Chia Ching Lin Hsing Yi Huang Huei Chun Liu Ph.D., Professor and Dean Simon J. T. Mao
138. Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD)
139. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. "Mahley R.W.Science 240:622-630(1988)
140. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Mahley RW Science. 1988 Apr 29; 240(4852):622-30.*
141. Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration. Am J Hum Genet 1998;63:200–206
142. Apolipoprotein E polymorphisms in Japanese patients with polypoidal choroidal vasculopathy and exudative age-related macular degeneration. Am J Ophthalmol 2004;138:567–573)
143. Local cellular sources of apolipoprotein E in the human retina and retinal pigmented epithelium: implications for the process of drusen formation. *Anderson DH, Ozaki S, Nealon M, Neitz J, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV Am J Ophthalmol. 2001 Jun; 131(6):767-81.*
144. Association of apolipoprotein E polymorphism with age-related macular degeneration and Alzheimer's disease in south-western Hungary. 2007 Mar 30; 60(3-4):169-72.
145. Apolipoprotein E Isoforms and AMD. *Toops KA, Tan LX, Lakkaraju A Adv Exp Med Biol. 2016; 854():3-9.*
146. Acetylation of alphaA-crystallin in the human lens: effects on structure and chaperone function." Biochim Biophys. Acta 1822:120-129(2012)
147. Clinical Detection of Precataractous Lens Protein Changes Using Dynamic Light Scattering. Archives Of Ophthalmology. 2008;126(12):1687–93. doi: [10.1001/archophthalmol.2008.507](https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2008.507)
148. Misfolded proteins and retinal dystrophies. Adv Exp Med Biol. 2010;664:115–21. doi: [10.1007/978-1-4419-1399-9_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1399-9_14) ; PubMed Central PMCID: PMC2955894

149. Roles for α -crystallins in retinal function and disease. *Prog Retin Eye Res* 2012; 31(6):576-604; PMID:22721717; <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.06.001>
150. *Xenopus* gamma-crystallin gene expression: evidence that the gamma-crystallin gene family is transcribed in lens and nonlens tissues. *Mol Cell Biol*. 1994 Feb; 14(2): 1355–1363.
151. Light-Induced Phosphorylation of Crystallins in the Retinal Pigment Epithelium *Int J Biol Macromol*. 2011 January 01; 48(1): 194–201. doi:10.1016/j.ijbiomac.2010.11.00
152. P Mitchell, W Smith, J. J Wang, Iris color, skin sun sensitivity, and age-related maculopathy. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 1998;105:1359-63
153. Mutation screen of β -crystallin genes in 274 patients with age-related macular degeneration Received 07 Oct 2009, Accepted 10 Apr 2010, Published online: 21 Jun 2010
154. Gamma-S crystallin gene (CRYGS) mutation causes dominant progressive cortical cataract in humans." *J. Med. Genet.* 42:706-710(2005)
155. A potential role for endogenous proteins as sacrificial sunscreens and antioxidants in human tissues
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.04.003>
156. Intravitreal injection of β -crystallin B2 improves retinal ganglion cell survival in an experimental animal model of glaucoma Published online 2017 Apr 6. doi: [10.1371/journal.pone.0175451](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175451)
157. β B2-Crystallin Promotes Axonal Regeneration in the Injured Optic Nerve in Adult Rats Cell transplant 2015;24(9):1829-44. Doi 10.3727/096368914X684583 Epub 2014 Oct 8
158. Effects of crystallin- β -b2 on stressed RPE in vitro and in vivo 2013 Jan;251(1):63-79. doi: 10.1007/s00417-012-2157-7. Epub 2012 Oct 17
159. The primary structure of the B2 chain of human alpha-crystallin." *Kramps J.A., de Man B.M., de Jong W.W.FEBS Lett.* 74:82-84(1977)
160. Expression and mechanism of alphaB-crystallin in retina and extraocular tissues and organs. Liu DM, Zhou S, Chen JM, Peng SY, Xia WT, Fa Yi, Zue Za Zi
014 Dec;30(6):470-3.)
161. Fort PE, Lampi KJ. New focus on alpha-crystallins in retinal neurodegenerative diseases. *Exp Eye Res* 2011; 92(2):98-103; PMID:21115004; <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2010.11.008>
162. Deficiency of α B crystallin augments ER stress-induced apoptosis by enhancing mitochondrial dysfunction. *Free Radic Biol Med* 2012; 1;53(5):1111-22; PMID:22781655; <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.042>
163. Human retinal pigment epithelium cell changes and expression of alphaB-crystallin: a biomarker for retinal pigment epithelium cell change in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 2007; 125(5):641-5; PMID:17502503; <http://dx.doi.org/10.1001/archophth.125.5.641>
164. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2006; 82 (1):99-110; PMID:16019000; <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2005.05.007> 34.
165. Chronic oxidative stress upregulates Drusen-related protein expression in adult human RPE stem cell-derived

RPE cells: a novel culture model for dry AMD. *Aging (Albany NY)* 2013; 5(1):51-66; PMID:23257616

166. Heat shock response and ionstasis: axis against neurodegeneration. *Aging (Albany NY)* 2012; 4(12):856-8; PMID:23257629

167. α B-crystallin regulation of angiogenesis by modulation of VEGF , Prepublished online 2009 Dec 18. Doi [10.1182/blood-2009-01-197095](https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-197095)

168. Structure and function of immunoglobulins. Schroeder H.W. Jr., Cavacini L.J. *Allergy Clin. Immunol.* 125:S41-S52(2010)

169. Leber congenital amaurosis linked to AIPL1: a mouse model reveals destabilization of cGMP phosphodiesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*